



Središnja medicinska knjižnica

Vlašić, Željka (2010) *Kondenzat izdaha kao komplementarna metoda u dijagnostičkoj procjeni djece s astmom i djece s gastroezofagealnom refluksnom bolešću*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/862>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Željka Vlašić

KONDENZAT IZDAHA KAO KOMPLEMENTARNA METODA U DIJAGNOSTIČKOJ
PROCJENI DJECE S ASTMOM I DJECE S GASTROEZOFAGEALNOM
REFLUKSNOM BOLEŠĆU

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ:

Zahvala

Kratice

Popis objavljenih radova

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1. 1. ASTMA	2
1. 1. 1. Definicija	2
1. 1. 2. Etiologija	3
1. 1. 2. 1. Genetski čimbenici	3
1. 1. 2. 2. Utjecaj okoliša	3
1. 1. 2. 2. 1. Specifični pokretači alergijske reakcije	5
1. 1. 2. 2. 1. 1. Alergeni	5
1. 1. 2. 2. 1. 2. Nespecifični pokretači alergijske reakcije	5
1. 1. 2. 2. 2. 1. Infekcije	5
1. 1. 2. 2. 2. 2. Duhanski dim	6
1. 1. 2. 2. 2. 3. Zagađivači, iritansi i vremenski uvjeti	6
1. 1. 2. 2. 2. 4. Prehrana	6
1. 1. 2. 2. 2. 5. Tjelesna aktivnost i stres	7
1. 1. 3. Fenotipovi astme	7
1. 1. 4. Patomehanizmi alergijske reakcije	8
1. 1. 4. 1. Strukturno – funkcionalne promjene	10
1. 1. 5. Postupci dijagnosticiranja astme	11
1. 5. 1. Diferencijalna dijagnoza astme i komorbiditet	14
1. 1. 6. Klasifikacija astme	14
1. 1. 7. Kontrola astme	15
1. 1. 8. Liječenje astme	17
1. 1. 8. 1. Mjere izbjegavanja alergena	17
1. 1. 8. 2. Farmakoterapija	17
1. 1. 8. 3. Edukacija o astmi	18
1. 2. GASTROEZOFAGEALNA REFLUKSNA BOLEST	18

1. 2. 1. Etiologija	18
1. 2. 2. Epidemiologija	19
1. 2. 3. Mehanizmi nastanka GERB-a	20
1. 2. 4. Klinička slika GERB-a	21
1. 2. 5. Diferencijalna dijagnoza GERB-a	21
1. 2. 6. Dijagnostičke pretrage kod GERB-a	21
1. 2. 6. 1. Dijagnostičke smjernice	22
1. 2. 7. Liječenje GERB-a	26
1. 2. 8. Prognoza GERB-a	26
1. 2. 9. GER i astma	26
1. 3. NEINVAZIVNA DIJAGNOSTIKA PLUĆNIH BOLESTI	28
1. 3. 1. Izdah	29
1. 3. 2. Kondenzat izdaha	30
1. 3. 2. 1. Uzorkovanje kondenzata izdaha	30
1. 3. 2. 2. Analiza kondenzata izdaha	32
1. 3. 2. 3. Prednosti i nedostaci analize kondenzata izdaha	33
2. OBRAZLOŽENJE TEME	35
2. 1. Hipoteza	35
2. 2. Ciljevi	36
3. EKSPERIMENTALNI DIO	38
3. 1. ISPITANICI I METODE	38
3. 1. 1. Ispitanici	38
3. 1. 2. Metode	41
3. 1. 2. 1. Ispitivanje plućne funkcije	41
3. 1. 2. 2. Određivanje izdahnutoga dušičnog oksida	42
3. 1. 2. 3. Određivanje 24-satnog pH jednjaka	42
3. 1. 2. 4. Kondenzat izdaha	42
3. 2. 4. 1. Uzorkovanje kondenzata izdaha	42
3. 2. 4. 2. Nadslojavanje kondenzata izdaha s argonom	43
3. 2. 4. 3. Određivanje pH, parcijalnog tlaka kisika i ugljika	44
3. 2. 4. 4. Određivanje koncentracije željeza, kalcija i magnezija	44

3. 2. 5. Statistička obrada	44
4. REZULTATI	47
4. 1. Ispitanici	47
4. 2. Plućna funkcija	47
4. 3. Izdahnuti dušični oksid	50
4. 4. Kondenzat izdaha	51
4. 4. 1. pH, parcijalni tlak kisika (pO_2) i ugljik dioksida (pCO_2)	52
4. 4. 2. Koncentracije željeza, kalcija i magnezija	58
4. 4. 3. analiza ROC krivulje	60
4. 5. Korelacija	65
5. RASPRAVA	70
6. ZAKLJUČCI	83
7. SAŽETAK	85
8. SUMMARY	86
9. LITERATURA	87
10. ŽIVOTOPIS	105

Ova je disertacija izrađena u Dječjoj bolnici Srebrnjak u Zagrebu

Zahvaljujem

- mentorici prof. dr. sc. Slavici Dodig za ideju, stručnu pomoć i savjete pri izradi disertacije,
- dr. sc. Mirjani Turkalj koja je odabrala bolesničke skupine i dala korisne savjete iz kliničke prakse,
- mr. sc. Bori Nogalu, za pomoć u odabiru bolesnika
- doc. dr. sc. Davoru Plavecu, i osoblju Odjela za ispitivanje plućne funkcije za za svesrdnu pomoć
- osoblju Odjela za pulmologiju i alergologiju predškolske i školske dobi, osobito glavnoj sestri Mariji Vodopija, VMS, za pomoć u pripremi bolesnika
- Osoblju Odjela za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku za susretljivost i pomoć pri radu
- ispitanicima, bolesnicima liječenim u Dječjoj bolnici Srebrnjak te dobrovoljcima osnovne škole Jordanovac, te učitelju Igoru Ankonu za susretljivost

Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenih projekata

1. Biokemijski biljezi u izdahnutom kondenzatu djece s plućnim bolestima, br. 277001.
2. Kondenzat izdaha kao izvor biomarkera plućnih bolesti u djece, br. 277-2770966-0965.

provođenih uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, kojem zahvaljujem.

Kratice

ARIA – alergijski rinitis i njegov utjecaj na astmu (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*)

ATS – Američko torakalno društvo (*American Thoracic Society*)

AUC – površina ispod krivulje (*Area Under the Curve*)

BAL – bronhoalveolarni ispirak (*bronchoalveolar lavage*)

CD – razlikovno obilježje (*Cluster of differentiation*)

EAACI – Europska akademija za alergologiju i kliničku imunologiju (*European Academy of Allergology and Clinical Immunology*)

F_ENO – frakcija izdahnutog dušičnog oksida (*fraction of exhaled nitric oxide*)

FEV₁ – forsirani ekspiracijski volumen zraka u prvoj sekundi

FVC – forsirani vitalni kapacitet

GINA – Međunarodni sporazum o dijagnosticiranju i o liječenju astme (*Global Initiative for Asthma*)

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

GLORIA – Sveobuhvatni elementi u alergiji (*Global Resources in Allergy*)

GM-CSF – faktor stimulacije kolonija granulocita I makrofaga (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

ICAM – međustanična adhezijska molekula (*inter-cellular adhesion molecule*)

IgE – imunoglobulin E

IL – interleukin

IQR – interkvartilni raspon (*interquartile range*)

ISAAC - Međunarodna studija o astmi i alergijama u djetinjstvu (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*)

kDa – kilodalton

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

LT – leukotrijen

MEF₂₅ – forsirani ekspiracijski protok pri 25% brzoga vitalnog kapaciteta

MEF₅₀ – forsirani ekspiracijski protok pri 50% brzoga vitalnog kapaciteta

MEF₇₅ – forsirani ekspiracijski protok pri 75% brzoga vitalnog kapaciteta

PAF – faktor agregacije trombocita (*Platelet Aggregation Factor*)

PEF – vršni ekspiracijski protok (*Peak expiratory flow*)

PG – prostaglandin

RANTES – kemokin kemoatraktant monocita, limfocita T, stanica ubojica, eozinofilnih i bazofilnih granulocita (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*)

RI – respiratorni inkeks

ROC-krivulja – (*Receiver Operating Characteristic Curve*) - krivulja koja odjeljuje pozitivne od lažno pozitivnih rezultata na različitim odsječcima na krivulji

SD – standardna devijacija

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

Th – pomagački limfocit T (*T-helper*)

TNF-alfa – faktor tumorske nekroze alfa (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

VCAM - adhezijska molekula krvožilne stanice (*vascular cell adhesion molecule*)

U – jedinica (*Unit*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization*)

\bar{x} – aritmetička sredina

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Ova je disertacija nastavak istraživanja čiji su rezultati objavljeni u znanstvenim časopisima, a bit će citirani prema rimskim brojevima (I – V):

- I. Dodig S, Čepelak I, Plavec D, **Vlašić Ž**, Nogalo B, Turkalj M. The effect of gas standardization on exhaled breath condensate pH and $p\text{CO}_2$. European Respiratory Journal 2007; 30: 185-7.
- II. Dodig S, Čepelak I, **Vlašić Ž**, Zrinski Topić R, Živčić J, Nogalo B. Partial oxygen and carbon dioxide pressure of exhaled breath condensate. Lab Med 2008;9:537-9.
- III. Dodig S, **Vlašić Ž**, Čepelak I, Zrinski Topić R, Turkalj M, Nogalo B. Magnesium and calcium in exhaled breath condensate of children with asthma and gastroesophageal reflux disease. J Clin Lab Anal 2009;23:34-9.
- IV. **Vlašić Ž**, Dodig S, Čepelak I, Zrinski Topić R, Živčić J, Nogalo B, Turkalj M. Iron and ferritin concentrations in exhaled breath condensate of children with asthma. J Asthma 2009;46:81-5.
- V. **Vlašić Ž**, Dodig S, Čepelak I, Plavec D, Nogalo B, Turkalj M, Raos M, Zimić L. Određivanje pH, parcijalnog tlaka kisika i ugljičnog dioksida u kondenzatu izdaha djece s astmom. Paediatrica Croatica 2009;53:7-11.

UVOD

Spozna je o patofiziološkim procesima u plućnim bolestima trajno se nadograđuju animalnim i humanim istraživanjima, uz primjenu metoda *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo*. Kvantifikacija upale u plućnim bolestima cijeli se niz godina temeljila na invanzivnim postupcima kao što su analiza bronhoalveolarnog ispirka (BAL, *bronchoalveolar lavage*) i bronhalnih bioptata (1), semikvantitativna analiza inducirano sputuma (2) ili tradicionalno, na mjerenju različitih upalnih biljega u serumu i mokraći. Ovi potonji odražavaju sistemska upala, a ne lokalnu upalu u plućima. Zbog invanzivne prirode spomenutih postupaka već se dugo ispituju mogućnosti dobivanja pogodnog uzorka manje neugodnim postupkom za bolesnika. Od plinovitih sastojaka izdaha najviše je ispitano značenje promjena dušikovog oksida (NO, odnosno frakcioniranoga, izdahnutog dušikovog oksida, *fractional exhaled nitric oxide*, F_ENO), čije se određivanje već primjenjuje u svakodnevnoj praksi, kako u odraslih tako i u djece (3, 4). Više od 15 godina u znanstvenoj se literaturi pojavljuju radovi koji se odnose na ispitivanje kondenzata izdaha (aerosolizirana ekstracelularna tekućina iz pluća) kao uzorka za ispitivanje izdahnutih biomarkera (5, 6). Pojava komercijalnog kondenzora izdaha (primjerice Erich JAEGER GmbH, Germany) pridonijela je brojnim istraživanjima, a broj radova u kojima su opisana ta istraživanja svakim je danom sve veći (7 - 11).

Upala sluznice dišnih putova jedna je od osnovnih značajki astme. Stoga su praćenje i liječenje upale u astmi osnovni cilj i međunarodnih smjernica (12, 13). Prije konačne primjene jednostavne i neinvazivne metode uzorkovanja i analize kondenzata izdaha, u svakodnevnoj kliničkoj praksi potrebno je optimizirati i standardizirati cijeli niz postupaka: od načina uzorkovanja, pohrane i obrade uzorka, analitičkih postupaka određivanja biokemijskih biljega u tom uzorku. Potrebno je i definirati čimbenike koji utječu na rezultate određivanja pojedinih biomarkera, odrediti referentne raspone, definirati njihovu dijagnostičku značajnost za pojedinu plućnu bolest i usporediti njihovu dijagnostičku vrijednost u odnosu na trenutne "zlatne standarde" u dijagnostici plućnih bolesti, te odrediti njihovu ulogu u praćenju djelotvornosti primijenjene terapije (14, 15). Ova disertacija upravo ima kao cilj ispitati vrijednost određivanja pH, željeza,

kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha u usporedbi s koncentracijom $F_{E}NO$ u izdahu, te parametrima plućne funkcije (FVC, FEV1, MEF₂₅, MEF₅₀, MEF₇₅, PEF) u djece s astmom i djece s gastroezofagealnom refluksnom bolesti (GERB). Astma je odabrana kao najčešća kronična bolest dišnog sustava u djece, a GERB zbog toga što se simptomi ove bolesti često preklapaju sa simptomima astme. Disertacija je proizašla iz znanstvenog projekta (Kondenzat izdaha kao izvor biomarkera plućnih bolesti u djece, br. 277-2770966-0965) provođenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

1. OPĆI DIO

1. 1. ASTMA

U razvijenim su zemljama alergijske bolesti najčešće imunološke bolesti. Očituju se simptomima u dišnom sustavu (alergijski rinitis i sinusitis, alergijska astma), koži (sindrom atopijski ekcem/dermatitis) i probavnom sustavu (alergijski ezofagitis, gastroenterokolitis). Prema istraživanjima Stipić-Marković i sur. (16) Zagreb pripada području s relativno niskom prevalencijom simptoma alergijskih bolesti: 12-mjesečna prevalencija simptoma astme iznosi 6,0%, alergijskog rinitisa 12,1%, a sindroma atopijski ekcem/dermatitis 7,8%. Astma je najčešća kronična bolest u djece u gotovo svim industrijaliziranim zemljama svijeta. U djece se astma može opisati kao „ponavljajuće atake opstrukcije dišnih putova i intermitentni simptomi povećanog odgovora dišnog puta na određene pokretače, kao što su tjelesna aktivnost, izloženost alergenima i virusne infekcije“ (17). Prevalencija i incidencija bronhalne astme zadnjih dekada su u porastu kako u općoj populaciji tako i u dječjoj odnosno adolescentnoj dobi (18).

1. 1. 1. Definicija

Prema međunarodnim smjernicama astma je sindrom obilježen 1. kroničnom upalom dišnih putova u kojoj sudjeluju mnoge stanice, a najvažnije su mastociti, eozinofilni granulociti i limfociti T; 2. u preosjetljivih osoba pojavom simptoma - bronhokonstrikcija, kašalj i pritisak u prsima, često noću ili pred jutro; 3. smetnjama u

protoku zraka – te su smetnje često reverzibilne te prođu spontano ili na terapiju; 4. bronhalnom hiperreaktivnošću (BHR) (12).

1. 1. 2. Etiologija

Astma je složena bolest s višestrukim uzrocima. Čimbenici rizika uključuju i genetsku predispoziciju i utjecaj vanjskih čimbenika.

1. 1. 2. 1. Genetski čimbenici

Istraživanja na blizancima pokazala su da utjecaj genetskih čimbenika na nastanak astme varira, ovisno o populacijama na kojima su istraživanja učinjena (19, 20). Čini se da je porast prevalencije alergijskih bolesti više posljedica okolišnih, a manje posljedica genetskih čimbenika. Mnoga djeca s astmom imaju zdrave roditelje, i obrnuto, mnogi roditelji s astmom imaju zdravu djecu (17). Brojna istraživanja o incidenciji i prevalenciji astme u djetinjstvu pokazale su da je prevalencija veća u dječaka nego u djevojčica u prvoj dekadi života (21), iako je jedna serijska studija presjeka (*cross-sectional study*) pokazala smanjivanje razlika među spolovima (22). Doduše, kako se djeca približavaju pubertetu, astma postaje češća u djevojčica, pogotovo u adipoznijih s ranijim nastupom puberteta (23). Iako je utvrđena povezanost bronhalne hiperreaktivnosti (24) i povećane koncentracije serumskog IgE s kromosomom 5q31 (25), povezanost atopije i točkaste mutacije visokoafinitetnog receptora za IgE s kromosomom 11q13 (26), povezanost eozinofilije s kromosomom 12q24 te mastocita s kromosomom 17q12-21 (27), genetska predispozicija za pojavu astme još uvijek ostaje nepoznata.

1. 1. 2. 2. Utjecaj okoliša

Bolest će se klinički očitovati nakon induciranja specifičnih pokretača (alergena), a na pojavu simptoma dodatan nepovoljan utjecaj imaju nespecifični čimbenici iz okoliša: onečišćenje iz atmosfere (kemikalije, pušenje), virusne infekcije, mala porođajna težina, način prehrane, tjelesna aktivnost (trčanje), snažni emocionalni podražaji (smijeh, plač), promjena vremena, hladan zrak, lijekovi (aspirin). Može se raditi o jednom pokretaču simptoma bolesti ili o više njih, a različite osobe imaju i različite

pokretače simptoma (12). Osim toga ističe se uloga socioekonomskog statusa (higijenska hipoteza), veličina obitelji, način prehrane i promjena crijevne flore, cijepljenje, neracionalna primjena antibiotika, itd (28). Izloženost čimbenicima okoliša u dojenačkoj dobi povezana je s ranom senzibilizacijom, a kombinacija senzibilizacije i izloženosti visokim koncentracijama trajnih alergena u kući utječe na trajnost astme i lošu plućnu funkciju u djece (17). U dojenačkoj dobi, nutritivna alergija s manifestacijama na koži, probavnom i dišnom sustavu češća je nego alergija na inhalacijske alergene (29). Postojanje nutritivne alergije rizični je faktor za razvoj simptoma astme u djece starije od 4 godine. S rastom i razvojem postupno se razvijaju i simptomi uzrokovani inhalacijskim alergenima. Mnoga dojenčad i predškolska djeca doživljavaju ponavljajuće epizode simptoma od strane bronha, posebice zviždanja u prsima i kašlja, počevši u dobi od nekoliko mjeseci, najčešće tijekom virusne infekcije donjeg dišnog sustava. Opisana su četiri različita obrasca ponavljajućeg zviždanja u djece (30, 31):

1. Kratkotrajno zviždanje – djeca koja imaju zviždanje u prsima u tijeku prve 2 - 3 godine života, ali te se epizode ne ponavljaju nakon 3. godine života
2. Ne-atopijsko zviždanje – najčešće je okidač virusna infekcija i teži remisiji kasnije u djetinjstvu
3. Trajna astma – zviždanje povezano sa sljedećim:
 - Kliničke manifestacije atopije (ekcem, alergijski rinitis i konjuktivitis, nutritivna alergija), eozinofilija, i/ili povećani ukupni IgE
 - Specifičnim IgE posredovana senzibilizacija na hranu u dojenačkoj dobi i ranom djetinjstvu, te posljedično senzibilizacija na najčešće inhalacijske alergene (32)
 - Senzibilizacija na inhalacijske alergene prije treće godine života, posebice na specifične alergene trajno prisutne u kućanstvu (17)
 - Astma u obiteljskoj anamnezi
4. Žestoko intermitentno zviždanje (31): mjestimična pojava akutnih epizoda zviždanja povezanog s niskim morbiditetom za vrijeme između infekcija dišnog sustava, te znakovima alergijske preosjetljivosti (npr. alergijska s senzibilizacija, ekcem, eozinofilija).

1. 1. 2. 2. 1. Specifični pokretači alergijske reakcije

1. 1. 2. 2. 1. 1. Alergeni

Alergeni su topljivi, za većinu ljudi benigni antigeni. U osoba s povećanom koncentracijom IgE-a i nasljednom sklonošću alergiji, pokreću alergijsku reakciju (reakciju preosjetljivosti) (33). Po kemijskoj strukturi su proteini ili glikoproteini, molekularne mase 15 do 40 kDa, a ako se radi o haptenu onda mogu biti i manje molekule koje su vezane na proteinsku molekulu (M_r 5 – 60 kDa) (34). Molekula alergena sadrži dvije ili više antigenskih determinanti (epitopa) koje se mogu križno povezivati s molekulama IgE na mastocitima i bazofilnim granulocitima. Bez obzira na kemijsku strukturu (jesu li enzimi, enzimski inhibitori, lipokalini ili strukturni proteini) alergeni u osoba s preosjetljivošću potiču jednaku alergijsku reakciju (35). Ta reakcija podrazumijeva indukciju sinteze IgE, povezivanje s IgE, oslobađanje medijatora alergijske reakcije iz imunokompetentnih stanica. Svi alergeni, dakle, imaju važna zajednička svojstva. Osnovno je da imaju takav trodimenzionalni oblik koji omogućuje da udubljenja unutar molekule lako postaju vezno mjesto za IgE (36). Klasična alergijska reakcija uključuje vezanje alergen-specifičnih IgE protutijela na mastocyte, potom ponovnu izloženost alergenima, nakon čega slijedi rana faza imunog odgovora koja uključuje otpuštanje medijatora iz mastocita i pojavu tipičnih simptoma alergije, nakon čega slijedi kasni imuni odgovor. Budući da ponavljana izloženost alergenima i alergijski imuni odgovor mogu oštetiti involvirana tkiva, utjecaj alergije može perzistirati i nakon otklanjanja alergena.

1. 1. 2. 2. 1. 2. Nespecifični pokretači alergijske reakcije

1. 1. 2. 2. 2. 1. Infekcije

Respiratorne virusne infekcije same po sebi najčešći su pokretači nastanka astme u djetinjstvu (37). Najčešći su među pokretačima rinovirusi, virus influence, parainfluence, adenovirusi, itd). Humani rinovirusi odgovorni su za većinu egzacerbacija astme, a respiratorni sincicijski virus je česti uzrok teških dišnih simptoma u dojenčadi (38). Teške respiratorne infekcije povezane su sa trajanjem astme kasnije u djetinjstvu (39), a ponavljajuće respiratorne infekcije mogu kasnije

pogoršati simptome astme. Infekcija može oštetiti dišni epitel, inducirati upalu i stimulirati imunu reakciju i bronhalnu hiperreaktivnost (40). Jednom kada infekcija prođe, ostaje hiperreaktivnost bronha kroz određeno vremensko razdoblje (41). Za sada nema dokaza da cjepiva davana tijekom prvih godina života djeteta modificiraju rizik za atopiju i astmu (42). Izloženost antibioticima tijekom dojenačke dobi povezana je s povećanim rizikom od nastanka astme (43). Izlaganje bakterijskim endotoksinima u najranijoj životnoj dobi, može štititi od astme, međutim u djece koja već imaju astmu, bakterijski endotoksini mogu pogoršati bolest (44).

1. 1. 2. 2. 2. 2. Duhanski dim

Pasivna izloženost duhanskom dimu je jedan od najjačih kućnih rizičnih čimbenika za razvoj rekurentnog zviždanja/kašlja ili simptoma astme u bilo kojoj dobi tijekom djetinjstva (45). Cigaretni dim povećava oksidativni stres i stimulira upalu u gornjim i donjim dišnim putovima. Dodatno, majčino pušenje u trudnoći rezultira usporenim rastom pluća kod fetusa, koji može biti povezan sa zviždanjem u ranom djetinjstvu (46). Stoga, izbjegavanje duhanskog dima jedan je od najvažnijih čimbenika u prevenciji kako astme, tako i ostalih respiratornih bolesti (47).

1. 1. 2. 2. 2. 3. Onečišćenja, iritansi i vremenski uvjeti

Učinak zagađenja zraka na razvoj astme izazvan prometom ili industrijom dobro je poznat (48). Uz izravan toksičan učinak na pluća, zagađivači zraka induciraju oksidativni stres, upalu dišnih putova, a mogu izazvati napad astme u onih koji su genetski predisponirani utjecaju oksidativnog stresa (49). Velik broj iritansa povezan je s respiratornim simptomima i astmom u djece, uključujući parfeme i klor (50).

Različiti vremenski uvjeti, uključujući ekstremne temperature i visoku vlažnost zraka povezani su s aktivnošću astme, uključujući egzacerbacije bolesti.

1. 1. 2. 2. 2. 4. Prehrana

Mnogim je istraživanjima dokazan koristan učinak dojenja na prevenciju razvoja atopijskih bolesti, posebno u djece s atopijom u obitelji (51). Čini se da korištenje ekstenzivne hidrolizirane formule ne smanjuje incidenciju astme (52). Dok striktno

izbjegavanje proteina kravljeg mlijeka i jaja može u neke djece smanjiti incidenciju atopijskog dermatitisa u prvoj godini života, izbjegavanje tih specifičnih proteina ne sprječava kasniji razvoj astme (53).

1. 1. 2. 2. 5. Tjelesna aktivnost i stres

Tjelesna aktivnost izazvati će znakove akutne egzacerbacije u velikog broja djece s astmom (54). Međutim, vježbom uzrokovan bronhospazam također može biti izolirani fenotip astme. Mehanizam bronhoopstrukcije i bronhospazma pri naporu podrazumijeva promjene u osmolarnosti dišnih putova, koje rezultiraju gubitkom vode i promjenama temperature dišnih putova (55). Redovne aerobne vježbe ključne su za zdravlje i ne bi se smjele izbjegavati.

Psihološki čimbenici, posebice kroničan stres, također mogu utjecati na aktivnost astme (56).

1. 1. 3. Fenotipovi astme

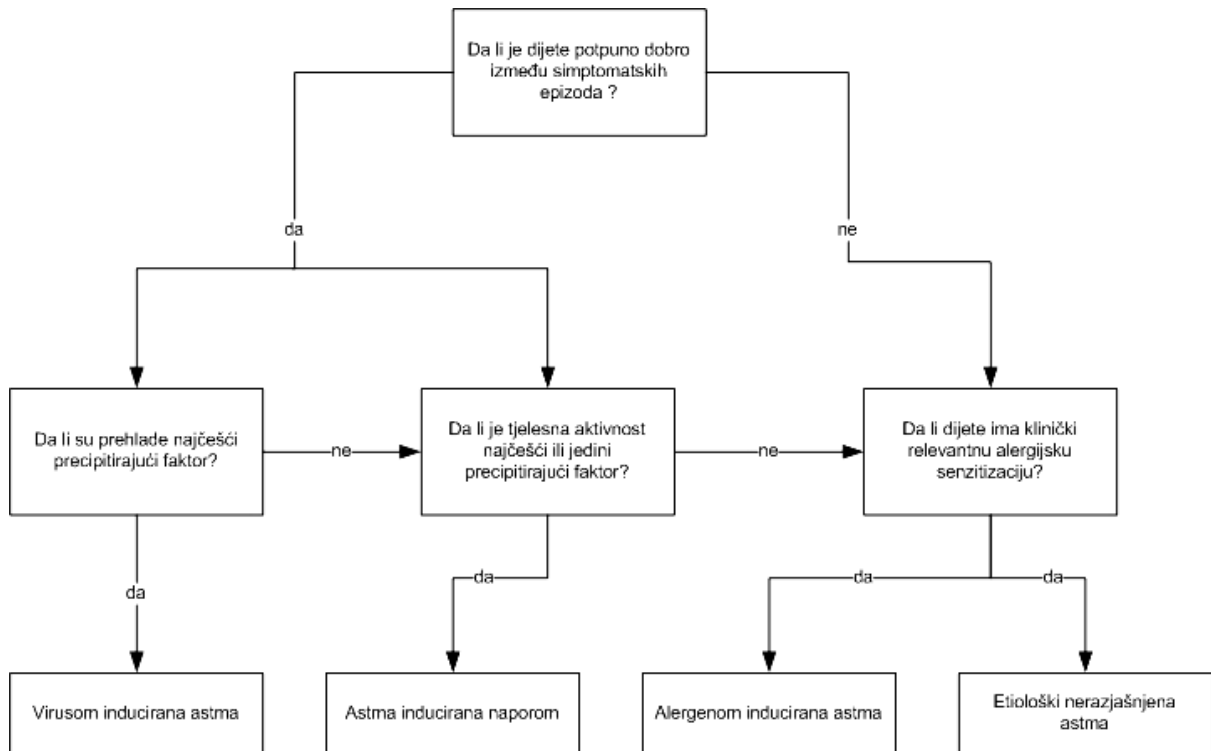
Dva kriterija, dob djeteta i definiranje pokretača astme, omogućuju karakterizaciju različitih fenotipova astme. Dob je jedna od najvažnijih odrednica fenotipa astme u djetinjstvu jer se bolest očituje na različite načine u različitim dobnim skupinama. Prema europskim smjernicama (13) u dijagnostičkom odnosno terapijskom pristupu treba imati u vidu sljedeće četiri dobne skupine u djece i adolescenata:

- dojenčad i mala djeca (0 do 2 godine)
- predškolska djeca (3 do 5 godina)
- školska djeca (6 do 12 godina)
- adolescenti

Temeljem kriterija pokretača predložena su četiri fenotipa – astma inducirana

- virusom
- vježbom
- alergenom, te
- neatopijska astma (ne pripada niti jednom od prethodnih fenotipova)

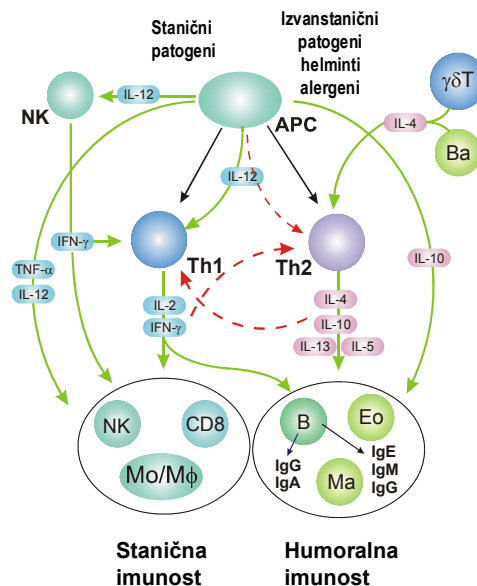
Iako postoji preklapanje fenotipova, osobito u djece starije od 2 godine, postupnici u definiranju različitih fenotipova (Slika 1) mogu pomoći u terapijskom pristupu (13).



Slika 1: Postupnik za određivanje fenotipova astme u djece starije od dvije godine (13)

1. 1. 4. Patomehanizmi alergijske reakcije

U patomehanizmu nastanka alergijske reakcije ključna je prevaga funkcije limfocita Th2. Ta jednostavna paradigma o neravnoteži između citokina izlučenih iz Th1 i Th2 limfocita dugo je bila korištena za opisivanje imunoloških abnormalnosti u astmi. No, čini se da su interakcije između podskupina limfocita T i pridruženih citokina mnogo kompleksnije i da se razlikuju ovisno o broju faktora koji uključuju dob i razne stimuluse (57,58). Ključne imunokompetentne stanice u održavanju te ravnoteže su dendritičke stanice (antigen prezentirajuće stanice) i regulacijski limfociti T (59). Mreža imunokompetentnih dendritičkih stanica, prikuplja antigene i provodi ih do regionalnih limfnih čvorova (60). Antigen prezentirajuće stanice „prerađuju“ alergen (antigen) (Slika 2), a potom pomagački limfociti T prepoznaju tako prerađeni alergen.



Slika 2. Patomehanizmi alergijske reakcije (63)

Limfociti T igraju glavnu i kompleksnu ulogu u patofiziologiji alergije. Subpopulacija pomagačkih limfocita T (Th2-limfociti) produkcijom citokina inducira sintezu protutijela IgE u limfocitima B, te aktivira eozinofilne granulocite koji podržavaju alergijsku upalu (61). Interleukini IL-4 i IL-13, koje luče aktivirani limfociti T, ključni su u indukciji Th2 imunološkog odgovora, sudjeluju u aktivaciji i proliferaciji limfocita B koji posljedično tome sintetiziraju IgE protutijela. Aktivirani limfociti T također luče i IL-5, koji potiče rast (proliferaciju) limfocita B, rast i diferencijaciju eozinofilnih leukocita te sazrijevanje eozinofila. Protutijela IgE vežu se na površinu mastocita čineći ih «aktiviranima». Ponovnim ulaskom alergeni premoštavaju molekule IgE-a na površini mastocita uzrokujući njihovu eksplozivnu degranulaciju (rana faza alergijske reakcije). Degranulacija mastocita dovodi do otpuštanja histamina i triptaze, a aktivacija membranskih fosfolipida potiče sintezu metabolita arahidonske kiseline (prostaglandini i leukotrieni). Mastociti otpuštaju i regulacijske molekule, citokine profila Th2 (IL-4, IL-5

i IL-13), kao i proupalne citokine IL-6, IL-10, IL-8 i TNF-alfa, te kemokine (RANTES) i eotaksin.

Aktivirani eozinofilni granulociti otpuštaju brojne upalne medijatore, ECP (*eosinophil cationic protein*, eozinofilni kationski protein), MBP (*major basic protein*, glavni bazični protein), EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*, neurotoksin podrijetlom iz eozinofilnoga granulocita), EPO (*eosinophil peroxidase*, eozinofilna peroksidaza), ali i drugi medijatori poput leukotriena, prostaglandina, PAF (*platelet activating factor* - faktor aktivacije trombocita), kemokina (*chemotactic chemokine*, kemotaktični kemokin CCL5; IL-8, TGF-beta1 - *transforming growth factor*, faktor transformacijskog rasta), te citokina IL-3, IL-5 i GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga) i proupalnih citokina. U alergijskoj reakciji sudjeluju i druge brojne stanice, primjerice makrofagi i stanice respiratornog epitela, endotelne stanice. Aktivirane epitelne i endotelne stanice pokazuju povećanu aktivaciju adhezijskih molekula ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*, intercelularna adhezijska molekula 1) i VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*, adhezijska molekula krvožilnih stanica-1), koje su odgovorne za regrutaciju i infiltraciju upalnim stanicama, dominantno eozinofilnim granulocitima i limfocitima (62, 63).

1. 1. 4. 1. Strukturno – funkcionalne promjene

Upala bronha glavno je obilježje većine pacijenata sa simptomima astme, a podrazumijeva promjene na razini epitela, nakupljanje upalnih stanica i otpuštanje mnogih upalnih medijatora. Bronhalna hiperreaktivnost posljedica je alergijske upale. Obilježja upale ovise o pokretaču i dobi, a mogu se razlikovati među fenotipovima astme. Upala može perzistirati do određenog opsega i u razdobljima između egzacerbacija (64). U upali sudjeluju eozinofilni granulociti, neutrofilni granulociti i limfociti T, koji infiltriraju epitel bronha. (65,66). Neutrofilna upala je povezana s virusnim pokretačima i težinom bolesti (67). Eozinofilna upala ukazuje na atopiju, a odgovorna je i za duljinu trajanja simptoma (68).

Uz upalu bronhalne sluznice odvijaju se i ostale promjene u dišnim putovima bolesnika s astmom. To su remodeliranje bronha, bronhoopstrukcija i bronhalna hiperreaktivnost.

Remodeliranje bronha je proces koji dovodi do ireverzibilnih promjena u strukturi bronha. Taj proces podrazumijeva hipertrofiju mišića, neoangiogenezu i povećanu prokrvljenost, kroničnu infiltraciju upalnim stanicama, hiperplaziju vrčastih stanica, depoziciju kolagena, zadebljanje bazalne membrane i smanjenje elastičnosti zida dišnih putova (69). Iako su ovakve abnormalnosti opisane i u odraslih i u djece, ipak su manje izražene u djece (65). Remodeliranje bronha opisano je u djece sa postvirusnim zviždanjem, ali postoje dokazi da se te promjene očituju tek nakon dojenačke dobi (70). Remodeliranje bi moglo biti pojačano djelovanjem Th2-imunog odgovora (71). Bronhalni epitel reagira na vanjske stimuluse i regulira procese upale i remodeliranja (72).

Opstrukcija bronha rezultat je upalne reakcije za vrijeme egzacerbacija astme. Dišni putovi obstruirani su uslijed edema, hipersekrecije sluzi i kontrakcije glatkih mišića. Ove promjene javljaju se u svim dobnim skupinama i svim fenotipovima astme i to je najčešće krajnji ishod induciran raznim pokretačima.

Hiperreaktivnost bronha može se definirati kao sklonost dišnih putova sužavanju nakon izlaganja različitim podražajima. Nastaje kao posljedica trajne upale bronhalnog stabla koja se očituje oštećenjem bronhalnog epitela i prisutnošću upalnih stanica. Inducirana je inhalacijom alergena te aktivacijom neutrofilnih i eozinofilnih granulocita. Testovi nespecifične bronhalne hiperreaktivnosti provode se inhaliranjem otopine metakolina u rastućim koncentracijama. Koncentracija i vrijeme trajanja ekspozicije određeni su aparatom na kojem se izvodi mjerenje. Test se provodi dok nije došlo do redukcije FEV₁ za 20%. Najniža koncentracija kod koje je došlo do redukcije FEV₁ uzima se kao mjera nespecifične bronhalne reaktivnosti. Ovisno o koncentraciji metakolina koja je izazvala pad FEV₁ od 20% govori se o blagoj, srednje teškoj i teškoj bronhalnoj hiperreaktivnosti.

Reakcija dišnih putova na nespecifične stimuluse je veća u dojenčadi i male djece nego u starije djece i odraslih (73). Hiperreaktivnost bronha također je obilježje i virusne infekcije, a može se očitovati neovisno o astmi.

1. 1. 5. Postupci dijagnosticiranja astme

Postavljanje dijagnoze astme u dojenčeta i malog djeteta dijagnostički je izazov, jer nema specifičnih imunoloških, bioloških ili fizioloških biljega za astmu. Stoga se dijagnoza astme postavlja temeljem više čimbenika - obiteljske anamneze, čimbenika rizika, opisa simptoma, dijagnostičkih testova i terapijskog odgovora (74). Na astmu bi trebalo posumnjati kod svakog djeteta s rekurentnim zviždanjem u prsima i epizodama kašlja. Najčešće je moguće postaviti dijagnozu samo nakon dugotrajnog praćenja, uzevši u obzir široki raspon diferencijalnih dijagnoza i prateći djetetov odgovor na bronhodilatacijsku odnosno protuupalnu terapiju. Postupci dijagnosticiranja astme dječje dobi uključuje:

- Povijest bolesti - anamnezu:
 - osobnu anamnezu (kašalj, zviždanje u prsima, pritisak u prsima, posebno u naporu, noću ili u rano jutro, tijekom respiratornih infekcija, kašalj nakon smijeha/plača, izloženost hladnom zraku, učestalost i trajanje simptoma, sezonska odnosno cjelogodišnja pojava simptoma, dob pojave, progresija simptoma, postojanje simptoma drugih atopijskih bolesti, itd.),
 - obiteljsku (postojanje astme, alergijskog rinitisa, sinuitisa, nosnih polipa, cistične fibroze),
 - socijalnu (opis stana ili kuće, grijanje, vlažnost, izloženost grinjama, plijesnima, kućnim ljubimcima, duhanskom dimu, stupanj edukacije roditelja, zaposlenost roditelja, itd.)
 - Kod dojenčadi i male djece (mlađe od 2 godine) potrebno je pitati o:
 - glasnom disanju, povraćanju povezanom s kašljem
 - retrakcijama prsnog koša
 - otežanom hranjenju
 - promjenama u respiratornoj frekvenciji
 - Kod djece starije od 2 godine potrebno je pitati o:
 - Osjećaju „nedostatka zraka“ (tijekom dana ili noći)
 - malaksalosti (smanjenoj aktivnosti u igri u usporedbi s vršnjacima, povećanoj iritabilnosti)
 - osjećaju „slabosti“

- lošim rezultatima u školi ili izostajanju iz škole uslijed učestalih simptoma nedostatka zraka, malaksalosti ili fizičkoj nemogućnosti obavljanja svakodnevnih školskih obveza
 - smanjenoj učestalosti ili intenzitetu tjelesne aktivnosti, npr. u sportu, satovima tjelesnog odgoja
 - izbjegavanju ostalih aktivnosti (npr. prekomjerno spavanje, posjeti prijateljima koji imaju kućne ljubimce)
 - specifičnim okidačima: sportu, satovima tjelesnog odgoja, tjelesnoj aktivnosti
 - Adolescente je potrebno pitati puše li.
- Klinički pregled treba uključivati opći status bolesnika uz obvezatan status gornjih i donjih dišnih putova (nalaz nad plućima ovisi o stupnju opstrukcije bronha), te postoje li mjerljivi pokazatelji egzacerbacije bolesti (broj respiracija u minuti, frekvencija pulsa, saturacija krvi kisikom) (75). Ključni klinički znakovi koji upućuju na atopijski fenotip su: atopijski dermatitis, suha koža, tamni podočnjaci, iritirane konjunktive, trajni edem nosne sluznice, iscjedak iz nosa.
 - Laboratorijsku obradu: određivanje apsolutnog broja eozinofilnih granulocita u krvi i obrisku nosne sluznice, koncentraciju ukupnih i specifičnih IgE u serumu, te po mogućnosti određivanje koncentracije eozinofilnog kationskog proteina (ECP, *eosinophil cationic protein*) u serumu, odnosno upalnih medijatora u induciranom sputumu, bronhoalveolarnom ispirku te ispirku nosne šupljine, analizom kondenzata izdaha.
 - Kožno alergološko testiranje (kožni prick test, ubodni test) (76). Testovi bi se trebali provoditi koristeći standardizirane metode i standardizirane ekstrakte alergena. Paleta alergena ovisi o dobi djeteta i individualnoj anamnezi i trebala bi varirati ovisno o lokalno-specifičnim alergenima. Interpretaciju rezultata i procjenu kliničke značajnosti trebao bi izvršiti iskusni kliničar
 - Procjena plućne funkcije: mjerenje PEF-a (*Peak Expiratory Flow*, vršni ekspiratorni protok), spirometrija u djece starije od 4 godine, framakodinamski test – postotak reverzibilnosti FEV1 nakon primjene bronhodilatorator, tjelesna

- pletizmografija (za mjerenje plućnog volumena i rezistencije u dišnim putovima), te plućni funkcijski testovi u dojenčeta (77, 78)
- Mjerenje dušičnog oksida u izdahu ($F_{E}NO$), što ga Američko torakalno društvo, te Europsko respiratorno društvo preporučuju kao dodatnu dijagnostičku pretragu i važan parametar u praćenju oboljelih od astme, kao pokazatelja stupnja inflamacije u dišnim putovima (79)
 - Pregled otorinolaringologa radi specifične dijagnostike i terapije koegzistirajućeg rinitisa i sinuitisa
 - Rendgenska snimka pluća (postero-anteriorna i lateralna) obično se preporuča u početnoj obradi djece koja imaju astmu, posebno ako su u egzacerbaciji bolesti. Radiogram pluća se preporučuje učiniti i ako postoji dilema glede dijagnoze bolesti, primjerice sumnja na strano tijelo, bronhiolitis, cističnu fibrozu, itd (80).

1. 1. 5. 1. Diferencijalna dijagnoza astme i komorbiditet

U djece s teškim oblikom rekurentnog zviždanja, ili u dojenčadi i male djece sa svakodnevnim simptomima zviždanja u prsima koje ne odgovara na terapiju, potrebno je isključiti ostale dijagnoze, te prisutnost otežavajućih faktora, kao što je gastroezofagealni refluks, rinitis, aspiracija stranog tijela, cistična fibroza ili strukturne abnormalnosti gornjih i donjih dišnih putova. Ovi slučajevi zahtijevaju bronhoskopiju fiberoptičkim bronhoskopom, BAL, CT toraksa ili 24-satnu pH-metriju jednjaka (81). Također, trebalo bi uzeti u obzir i odgovor na terapiju. Ako ne uspije terapija s inhalacijskim kortikosteroidima (ICS), antagonistima leukotrijenskih receptora (LTRA - leucotriene receptor antagonist) ili bronhodilatatorima, potrebno je ponovno promisliti o dijagnozi astme.

1. 1. 6. Klasifikacija astme

Astma se u neliječenih bolesnika, prema težini kliničkih simptoma, opstrukciji dišnih putova i varijabilnosti plućne funkcije, klasificira u četiri kategorije: povremena, blaga trajna, umjerena trajna i teška trajna astma (Tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija težine astme prema kliničkim simptomima prije započinjanja liječenja.

Intermitentna astma
Simptomi manje od jednom tjedno Kratke egzacerbacije Noćni simptomi ne više od dvaput mjesečno <ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ili PEF $\geq 80\%$ • PEF ili FEV1 varijabilnost $< 20\%$
Blaga trajna astma
Simptomi više od jednom tjedno, ali manje od jednom dnevno Egzacerbacije mogu utjecati na aktivnost ili spavanje Noćni simptomi više od dvaput mjesečno <ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ili PEF $\geq 80\%$ • PEF ili FEV1 varijabilnost $< 20\text{-}30\%$
Umjerena trajna astma
Simptomi svakodnevno Egzacerbacije mogu utjecati na aktivnost ili spavanje Noćni simptomi više od jednom tjedno Svakodnevno korištenje inhalacijskih kratko djelujućih $\beta 2$ -agonista <ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ili PEF $60\text{-}80\%$ • PEF ili FEV1 varijabilnost $> 30\%$
Teška trajna astma
Simptomi svakodnevno Česte egzacerbacije Česti simptomi noćne astme Ograničenje fizičke aktivnosti <ul style="list-style-type: none"> • FEV1 ili PEF $\leq 60\%$ • PEF ili FEV1 varijabilnost $> 30\%$

1. 1. 7. Kontrola astme

Kontrola astme može se definirati na više načina. Ona bi mogla značiti da su simptomi bolesti prevenirani ili da je čak došlo do izlječenja. U astmi nijedna od prethodno navedenih opcija nije realna, pa se pojam kontrola uglavnom odnosi na kontrolu očitovanja simptoma bolesti. U idealnoj situaciji, to se ne odnosi samo na kliničke

manifestacije bolesti već i na promijenjene laboratorijske biljege upale – sve te promjene rezultat su odvijanja patofizioloških procesa svojstvenih alergijskoj reakciji. Provođenjem terapije lijekovima za kontrolu astme („kontroleri“) smanjuje se upala i time postiže klinička kontrola bolesti, ali zbog visoke cijene i nemogućnosti provođenja različitih testova (endobronhalna biopsija, određivanje eozinofilnih granulocita u sputumu i F_{ENO}), preporučeno je da se liječenje usmjeri na kontrolu kliničkih obilježja bolesti te plućne funkcije bolesnika. Koristeći upravo simptome i znakove bolesti te mjereći parametre plućne funkcije PEF ili FEV₁ (PEF - *peak expiratory flow* / vršni protok zraka, FEV₁ - *forced expiratory volume* / forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi), astma se može svrstati u tri skupine: kontrolirana, djelomično kontrolirana i nekontrolirana astma (Tablica 2). Potpuna kontrola astme često se postiže lijekovima, kontrolom okoliša, izbjegavanjem pokretača alergijske reakcije i respiratornih infekcija, a i cilj je u tome da se kontrola bolesti održi kroz dulji vremenski period.

Tablica 2. Razine kontrole astme prema GINA-smjernicama (liječeni bolesnici)(12)

Osobine bolesti	Kontrolirana (sve od navedenog)	Djelomično kontrolirana (svako mjerenje prisutno u svakom tjednu)	Nekontrolirana
Dnevni simptomi	Nema (dvaput ili manje u tjednu)	Više od dvaput tjedno	Tri ili više obilježja djelomično kontrolirane astme prisutna u svakom tjednu
Ograničenja aktivnosti	nema	ponekad	
Noćni simptomi/buđenje	nema	ponekad	
Potreba za lijekovima	Nema (dvaput ili manje u tjednu)	Više od dvaput tjedno	
Plućna funkcija (PEF ili FEV ₁)	normalna	Manje od 80% predviđenog	
Egzacerbacije	nema	Jednom ili više /godišnje	Jednom svaki tjedan

1. 1. 8. Liječenje astme

Liječenje astme zahtijeva opsežan plan, koji uključuje izbjegavanje alergena iz zraka te brojnih iritansa (gdje je moguće), prikladnu farmakoterapiju i edukaciju u «astma školi» s programima za pacijente, roditelje i skrbnike. U pojedinim se pacijenata provodi i specifična imunoterapija.

1. 1. 8. 1. Mjere izbjegavanja alergena

Primarna prevencija predstavlja uklanjanje svakog rizičnog čimbenika prije nego što izazove senzibilizaciju, sekundarna prevencija podrazumijeva dijagnozu i terapiju u najranijoj mogućoj fazi razvoja bolesti, a tercijarna prevencija dijagnozu i terapiju u već razvijenoj bolesti (82). Izbjegavanje nekih alergena (alergeni epitela i dlake mačke, psa, hrčka, konja) može smanjiti incidenciju simptoma i spriječiti senzitivizaciju. Alergeni koji se mogu izbjeći su alergeni hrane, alergeni kućnih ljubimaca, grinja iz kućne prašine. Kod dojenčeta ili djeteta s nutritivnom alergijom, ingestija hrane može izazvati akutnu sistemsku reakciju (anafilaksiju). Preporučuje se potpuno izbjegavanje takve hrane. Iako je malo dokaza koji ukazuju da izbjegavanje kućnih ljubimaca smanjuje rizik senzibilizacije, čini se da potrebno otprilike 6 mjeseci nakon uklanjanja kućnog ljubimca da se količina alergena smanji na razinu kod koje će se smanjiti alergijske reakcije (83). Broj grinja u kući može se smanjiti pojačanim higijenskim mjerama (uključujući redovito pranje posteljine i odjeće u vrućoj vodi, korištenje prekrivača za madrace), održavanjem manje vlažnosti provjetravanjem prostorija ili primjenom skupljača vlage (74). Osim spomenutih specifičnih pokretača astme potrebno je izbjegavati i nespecifične pokretače (duhanski dim, ostali iritansi, a također, ako je moguće stres i infekcije).

1. 1. 8. 2. Farmakoterapija

Cilj je farmakoterapije kontrola simptoma i prevencija egzacerbacija s minimumom nuspojava primijenjenih lijekova. Stoga se primjenjuju simptomatski lijekovi (*reliever medications*), kojima se liječi akutni napadaj bronhoopstrukcije te osnovni lijekovi (*controller medications*) kojima se suprimira alergijska upala u dišnim putovima i

preveniraju egzacerbacije bolesti. Skupinu simptomatskih lijekova čine: β 2- agonisti kratkog djelovanja i ostali bronhodilatatori – najčešće primjenjivani lijek je salbutamol. Osnovni lijekovi koji se preporučaju u astmi su: inhalacijski kortikosteroidi i antagonisti leukotrijenskih receptora (LTRA). Preporučuje se primjena lijekova u inhalacijskom obliku, putem zračnih komorica, koje za primjenu u male djece imaju i masku. Tako lijek brže dopire na željeno mjesto – u donje dišne putove, gdje je i njegovo djelovanje najpotrebnije (12, 13).

1. 1. 8. 3. Edukacija o astmi

Mnoga su istraživanja pokazala su da se dobra kontrola bolesti ne postiže samo uzimanjem lijekova, već i velikim dijelom edukacijom. Edukacijski programi osmišljeni su za osoblje (liječnike i medicinske sestre) koje se bavi djecom s astmom, također i za djecu, njihove roditelje i djelatnike škola koje djeca pohađaju. Tečajevi izobrazbe sastoje se od radionica, dijelom teorijskih, dijelom praktičnih, tijekom kojih su svi sudionici upoznati sa svim važnim pojedinostima vezanih uz astmu (prepoznavanje simptoma, način uzimanja terapije, samopomoć, izbjegavanje pokretača alergijske reakcije itd.). Na taj se način povećava znanje o bolesti i smanjuje strah od nepoznatog. Samo uz dobru edukaciju i redovito uzimanje lijekova mogu se postići osnovni ciljevi: astmu staviti pod nadzor, a simptome smanjiti na najmanju moguću mjeru.

1. 2. GASTROEZOFAGEALNA REFLUKSNA BOLEST

1. 2. 1. Etiologija

Gastroezofagealni refluks (GER) nevoljno je vraćanje želučanog sadržaja u jednjak. U svim dobnim skupinama radi se o fiziološkoj pojavi koja se može pojaviti više puta na dan. Ne uzrokuje patološke promjene na sluznici jednjaka ni simptome bolesti (84-86). GER može imati i pozitivnu ulogu – u slučajevima prevelikog obroka hrane kratkotrajni refluksi "preobilnog" sadržaja iz želuca dovode do dekompresije želuca i time olakšavaju postprandijalne smetnje. Fiziološki GER se ne liječi, ali ako pojedini čimbenici (poremećeni valvularni mehanizam donjeg sfinktera jednjaka, promjena

funkcije propulsivne «pumpe» jednjaka i rezervoara hrane - želuca, te smanjena otpornost sluznice jednjaka na prisutnost želučanog sadržaja) nadvladaju obrambene mehanizme zaštite i uzrokuju oštećenje sluznice jednjaka i/ili simptome bolesti (86), govori se o o gastroezofagealnoj refluksnoj bolesti (GERB), koja iziskuje liječenje. Klinički znakovi i simptomi usko povezani s GER su: regurgitacija (vraćanje želučanog sadržaja do usne šupljine bez povraćanja) i povraćanje (eksplozivno izbacivanje želučanog sadržaja kroz usta, zbog stimulacije centra za povraćanje u dorzoretikularnoj formaciji) (87).

GER može biti primarni i sekundarni (84,85). Primarni GER je funkcionalni poremećaj gornjeg probavnog sustava, dok je sekundarni GER posljedica dismotiliteta jednjaka različitih uzroka (npr. kroničnog tonzilitisa, neurološke bolesti, alergije na hranu, metaboličkih poremećaja, kao nuspojava lijeka itd.). Uloga refluksa duodenalnog sadržaja kroz želudac u jednjak, pod nazivom duodenogastroezofagealni refluks (*bile reflux*), u odraslih poznat entitet, još je u djece nedovoljno istražen (88).

1. 2. 2. Epidemiologija

Epidemiološka istraživanja GER u djece donedavno su se temeljila na simptomima (bljućkanje ili regurgitacija), što se smatralo fiziološkom pojavom u ranom djetinjstvu. Novijim metodama, određivanjem pH jednjaka tijekom 24 sata (24 -satna pH-metrija jednjaka) i endoskopijom probavnog sustava utvrđeno je da se GER može naći u 100% djece mlađe od 3 mjeseca, 40% u djece mlađe od 6 mjeseci i u oko 20% djece do 12 mjeseci života (89,90). Međutim, smetnje koje ukazuju na GERB mogu se pojaviti u oko 8% dojenčadi (85). Prema nekim istraživanjima 50% djece ima regurgitacije više od 2 puta na dan; 7% ih zbog simptoma GER-a odlazi na pregled liječniku, a 2% se liječi i obrađuje kod specijalista gastroenterologa (87).

Pojava GER-a u nedonoščadi još je nedovoljno istražena. Drži se da je GER u te djece čest, no nema odgovarajućih preporuka glede dijagnostičkih i terapijskih postupaka. Informacije o incidenciji, dijagnozi i liječenju GERB-a u toj populaciji su ograničene i često kontradiktorne, te zahtijevaju dodatna istraživanja (91,92). Uloga nasljeđivanja GER-a, a posebice težih oblika GERB-a ima posebnu važnost u djece (87, 93).

S obzirom na šarolikost kliničkih slika, uključujući i one koje se ne odnose na probavne smetnje (tj. plućna i neurološka simptomatologija), te zbog veće dostupnosti i češću primjenu odgovarajućih pretraga (24-satna pH-metrija i endoskopija), za očekivati je da će se sve više otkrivati njegova značajna socio-ekonomska i zdravstvena uloga (93).

1. 2. 3. Mehanizmi nastanka GERB-a

Transformacija fiziološkog GER-a u GERB, ovisi o međudjelovanju triju komponenti (83, 94):

- valvularnog mehanizma (donjeg sfinktera jednjaka),
- propulsivne «pumpe» jednjaka i rezervoara hrane (želuca), te
- otpornosti sluznice jednjaka na prisutnost želučanog sadržaja.

Valvularni mehanizam uvjetuje učestalost i količinu refluksnog sadržaja iz želuca. Predstavlja «antirefluksnu barijeru» odnosno prvu liniju obrane od GERB-a. Djelotvornost valvularnog mehanizma ovisi o tlaku i prolaznoj relaksaciji donjeg ezofagealnog sfinktera te o Hissovom kutu, odnosno o anatomskom statusu donjeg dijela jednjaka. Karakteristike valvularnog mehanizma određuju učestalost i volumen vraćanja želučanog sadržaja u jednjak (83, 92). Druga linija obrane, ezofagealni klirens, određuje dužinu zadržavanja želučanog sadržaja u jednjaku, odnosno kontakta istog sa sluznicom jednjaka. Ovisi o inervaciji jednjaka, ali i o nekim vanjskim čimbenicima, poput položaja tijela ili tjelesne aktivnosti (83, 86, 87).

Karakteristike želuca (volumen, prilagodljivost, brzina pražnjenja, količina želučane kiseline, prisutnost *Helicobacter pylori* i sl.) također mogu mijenjati jačinu i trajanje GER-a, odnosno pogodovati razvoju GERB-a (95, 96). Uloga žučnih soli i enzima gušterače u duodenogastroezofagealnom refluksu nije dovoljno poznata, ali ima radova koji upućuju na to da je njihova prisutnost važan element u nastanku težih oblika GERB-a (88).

Treća linija obrane odnosi se na niz svojstava sluznice jednjaka, odnosno njenih obrambenih snaga. To su sastav i količina sluzi, građa sluznice te krvna opskrba i acidobazna svojstva tkiva (83). Kad zakažu spomenuti mehanizmi, nastaje oštećenje sluznice kao posljedica kontakta s kiselim sadržajem želuca.

U posljednje vrijeme sve se češće spominje uloga nasljeđivanja težih oblika GERB-a, što je posebno važno u djece (87, 127).

1. 2. 4. Klinička slika GERB-a

U svakoj bolesti klinička je slika (anamneza, fizikalni nalaz) temelj na kojem se gradi dijagnostički postupak do postavljanja konačne ispravne dijagnoze. Simptomi GER-a bitno ovise o djetetovoj dobi. Potrebno je prvenstveno izdvojiti najmlađu dobnu skupinu, jer samo 5 do 15% dojenčadi s izraženim bljućkanjem razvija kliničku sliku GERB-a. (85, 98). U većeg djeteta simptomi su slični onima u odrasloj dobi (99). Osim klasićnih smetnji u probavnom sustavu, GERB se može oćitovati nizom simptoma drugih organskih sustava (dišni sustav – kašalj, "proćišćavanje grla", promuklost; živćani sustav – Sandifer sy- u dojenćadi- opisan kao kratkotrajni trzajevi i zabacivanje glavice prema natrag, slićno konvulzivnoj ataki) (100, 101).

1. 2. 5. Diferencijalna dijagnoza GERB-a

S obzirom na razlićitost simptoma i diferencijalna dijagnoza može biti vrlo šarolika (90, 99). Primjerice, povraćanje može biti uzrokovano i drugim bolestima u probavnom sustavu (pseudoopstrukcijom, opstrukcijom), ali i bolestima drugih sustava (povećanje intrakranijalnog tlaka, metabolićki poremećaj, nuspojava lijekova i dr.).

Simptomi dišnog sustava mogu biti posljedica anatomskih promjena (fistula, laringomalacija, kompresija vaskularnim prstenom), stranog tijela i primarno respiratornih bolesti poput astme. Apnea može biti i centralnog podrijetla ili opstruktivna. Bol u području ųlićice ili iza sternuma može upućivati na ulkusnu bolest ili gastritis, a diferencijalno dijagnostićki treba razmotriti i srćanu bol te bol u samoj prsnoj kosti ili strukturama u medijastinumu. Od neuroloških i drugih poremećaja u obzir dolaze konvulzije, tortikolis i neke metabolićke bolesti koje se mogu prikazati simptomima GERB-a.

1. 2. 6. Dijagnostićeke pretrage kod GERB-a

Dijagnostićeke pretrage u dokazivanju GERB-a biraju se ovisno o vodećim simptomima, o djetetovoj dobi, o najvjerojatnijem uzroku poremećaja i posljedici

refluksa, ali i o dostupnosti pojedinih metoda. Zlatnim standardom za dijagnozu i procjenu kiselog refluksa smatra se 24-satno mjerenje kiselosti sadržaja u jednjaku, (24-satna pH-metrija jednjaka) (98, 102). Dijagnostička osjetljivost te metode je 88%, a specifičnost 98% (85). Velika je prednost ove pretrage snimanje tijekom 24 sata, kao i mogućnost povezivanja položaja tijela, obroka i simptoma s refluksnim epizodama, na temelju izračunavanja indeksa simptoma i indeksa vjerojatnosti pridruženih simptoma (SI, engl. *Symptom Index* i SAP, engl. *Symptom Associated Probability*). Nedostatak 24-satne pH-metrije jednjaka je u tome što se ne uočavaju strukturne anomalije, aspiracije i ne detektira se alkalni refluks (85, 92, 98, 102).

Rendgenološke kontrastne pretrage opravdane su u dijagnostici GER-a samo u slučaju potrebe diferencijalne dijagnoze ostalih razloga povraćanja. Inače zbog velikog postotka lažno pozitivnih ili lažno negativnih nalaza, uz ionizirajuće zračenje, nemaju veće značenje u dokazivanju GER-a i prikazivanju GERB-a (85, 94). Ezofagogastroskopija je pretraga izbora kod sumnje na ezofagitis. Njome je, uz biopsiju koja je uvijek indicirana, moguće utvrditi stupanj ezofagitisa, Barrettov ezofagus i anomalije toga područja (94, 103, 104).

Scintigrafija jednjaka nije standardizirana pretraga i izvodi se postprandijalno, kad je i inače učestalost refluksa veća, što umanjuje njenu dijagnostičku vrijednost. Međutim, to je jedina metoda kojom se može dokazati eventualna aspiracija nastala kao posljedica refluksa.

Manometrija jednjaka i donjeg ezofagelnog sfinktera nema veću ulogu u dijagnostici GERB-a. Otkriva dismotilitet jednjaka, što ima prediktivnu vrijednost za uspješnost kirurškog zahvata u području donjega ezofagealnog sfinktera (85, 94, 104).

Ultrazvuk u dijagnostici GER-a ili GERB-a novijeg je datuma. Nema još jasno postavljeno mjesto u algoritmu dijagnostičkih pretraga.

1. 2. 6. 1. Dijagnostičke smjernice

Specifični elementi u anamnezi i statusu na koje treba posebno obratiti pozornost jesu:

- a) anamneza hranjenja (broj i količina obroka, podrigivanje, ponašanje za vrijeme jela)

- b) opis povraćanja (učestalost, bolnost – nemir kod povraćanja, povraćanje s naporom ili bez napora), povezanost s drugim simptomima poput vrućice, proljeva, simptomima respiratornog ili neurološkog sustava,
- c) prethodna anamneza (nedonošće, ponavljajuće bolesti s naglaskom na bolesti dišnog sustava, apnea – sindrom iznenadne dojenačke smrti)
- d) psihosocijalno okruženje (odnos majka – dijete, izloženost stresu, bolest u obitelji, porodična alergijska podloga)
- e) rast i razvoj djeteta (krivulja rasta)

U ostalim slučajevima, temeljem anamneze i statusa odlučuje se o radnoj dijagnozi i sukladno tome o daljnjim postupcima. S obzirom na raznolikost kliničke slike, dobne osobitosti, specifičnosti dijagnostike (endoskopske pretrage, nedovoljna dostupnost aparata za 24-satnu pH-metriju) kao i brojne terapijske mogućnosti (uključujući i operativno liječenje) dijagnoza GERB-a i njeno razlikovanje od fiziološkog GER-a vrlo je zahtjevno. Odabir postupnika ovisi o dobi djeteta i kliničkoj slici. Stoga je u racionalnom pristupu dijagnostici GER-a, odnosno GERB-a korisno razlikovati sljedeće kategorije bolesnika:

1. tipični simptomi GER-a, bez pridruženih komplikacija u dojenčadi i male djece
2. povraćanje i slabije napredovanje dojenčadi i male djece
3. sumnja na ezofagitis
4. retrosternalna bol kao moguća posljedica GER-a
5. neuobičajena slika GER-a

Što se tiče procjene težine i progresije bolesti, ona se zasada uglavnom temelji na klinički opisanim simptomima i testovima plućne funkcije. Simptomi bolesti i nalaz ventilacije pluća varijabilni su ovisno o stupnju bronhoopstrukcije i ne daju potpuno točan uvid u težinu astmatskog napadaja. Poznato je da dugotrajniji upalni procesi mogu postojati daleko prije promjena u plućnoj funkciji, odnosno u ventilacijskim parametrima (105,106).

1. 2. 7. Liječenje GERB-a

Liječenje primarnog GERB-a može se podijeliti u tri stupnja (84, 86, 87).

1. promjena svakodnevnih životnih navika
2. medikamentozna terapija prokineticima i lijekovima koji smanjuju sekreciju želučane kiseline
3. operativni zahvat

Terapija započinje postupcima definiranim u 1. stupnju, u pravilu u primarnoj zaštiti. Prvi stupanj terapije GERB-a indiciran je kao samostalna terapija u slučajevima nekomplikiranog GER-a, ali i kao suportivni dio terapije GERB-a. Liječenje podrazumijeva prvenstveno modifikaciju svakodnevnih životnih navika (izbjegavanje masne, slatke i previše začinjene hrane te mliječnih proizvoda, a favoriziranje voća i povrća u prehrani; preraspodjelu obroka tijekom dana tako da ih bude što više, a prilikom svakog što manja količina hrane; izbjegavanje gaziranih pića uz preporuku pijenja vode, spavanje sa povišenim uzglavljem; fizičku aktivnost i smanjenje povećane tjelesne mase; apstinenciju od alkohola, pušenja). Navedene preporuke potrebno je provoditi 2 do 4 tjedna. Ako ne dođe do značajnog poboljšanja treba utvrditi je li riječ o GERB-u te, ukoliko je potrebno, započeti s drugim, odnosno medikamentoznim stupnjem terapije GERB-a. Liječenje 2. i 3. stupnja trebao bi odrediti specijalist gastroenterolog.

Najčešće spominjani dio 1. stupnja terapije je adekvatan položaj ležanja djeteta. U veće djece, kao i u odraslih, to je položaj na lijevom boku uzdignutog uzglavlja, koji smanjuje broj refluksnih epizoda (104, 107). Pitanje optimalnog položaja dojenčadi kontroverzno je. Naime, premda je položaj na prsima blagotvoran glede refluksa (brže pražnjenje želuca, manji broj refluksnih epizoda, manji plač i nemir djeteta, manja opasnost od aspiracije), epidemiološki podatci upućuju na to da je potrbušni položaj rizičan za pojavu sindroma iznenadne dojenačke smrti (SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome*) (učestalost 4,4 na 1000 živorođene djece u odnosu na manje od 0,1 u položaju na leđima) (108). Dakle, treba pomno odvagati rizike SIDS-a s jedne strane i štetne posljedice GERB-a s druge i individualno savjetovati roditelje. Drugi važan element 1. stupnja terapije jest način prehrane. Savjeti ovise o djetetovoj dobi. Kod dojene dojenčadi ne mijenja se način prehrane. U dojenčadi hranjene adaptiranim

kravljim mlijekom preporuča se dodati u obrok hranu koja «zgušnjava», primjerice rižinih pahuljica (sluzi) ili rogačevog brašna. Time se povećava viskoznost hrane. Alternativno se mogu primijeniti i posebni gotovi pripravci, tzv. antiregurgitacijske formule (85, 87). Treba izbjegavati obilne obroke i paziti da ne dolazi do aerofagije. Pri sumnji na alergiju na kravlje mlijeko kao uzroku GER-a, uputno je učiniti gastroenterološku procjenu dijagnoze prije uvođenja dijetalnog režima, premda ima autora koji zagovaraju dvotjednu «probnu» prehranu semielementarnim pripremkom (87). U veće djece potrebno je izbjegavati čokoladu, gazirana pića, masniju hranu (zasićene masnoće), te u adolescenata i kofein, alkohol, pušenje cigareta (85, 87). Valja istaknuti da i pasivno pušenje može smanjiti tlak donjeg ezofagealnog sfinktera i povećati mogućnost GER-a (87, 104, 107). Nadalje, treba izbjegavati usku odjeću i paziti na tjelesnu masu. Debljina pogoduje GER-u, jer dovodi do povećanja intraabdominalnog tlaka. Dodatna mjera opreza pri liječenju GER-a je izbjegavanje lijekova koji smanjuju tlak donjeg ezofagealnog sfinktera (antikolinergici, adrenergici, ksantini, blokatori kalcijevih kanala, prostaglandini). Jedini lijekovi koji dolaze u obzir u 1. stupnju terapije su antacidi, no oni nisu našli odgovarajuće mjesto u liječenju simptoma GERB-a u djece. Zbog nuspojava (konstipacija kod davanja aluminijevog hidroksida, odnosno proljev kod primjene magnezijevog hidroksida) ove lijekove treba davati kontrolirano i u kratkom razdoblju (104, 107, 109).

Drugi stupanj terapije GERB-a najčešće podrazumijeva kombinaciju prokinetika i lijekove koji smanjuju sekreciju želučane kiseline. Među prokineticima cisaprid je pouzdano na prvome mjestu. To je stimulator postganglijskih neurona mijenteričnog plexusa uzduž cijelog probavnog trakta. Njegov je efekt u povećanju tlaka donjeg ezofagealnog sfinktera. Osim toga, pospješuje brže pražnjenje hrane iz želuca. Zbog svojih nuspojava (produljuje QT interval u EKG-u i povezuje se s nastankom težih srčanih aritmija) njegova je upotreba danas ograničena i zahtijeva oprez, no nije ukinuta u pedijatriji (85, 103, 104). Drugi se prokinetici u liječenju djece još rjeđe primjenjuju. Dvije su skupine supresora lučenja želučane kiseline. To su antagonisti druge skupine histaminskih receptora (ranitidin, famotidin) koji se u dječjoj dobi relativno često rabe. U novije se vrijeme, sve češće i u dječjoj dobi, s vrlo dobrim i sigurnim učinkom primjenjuju inhibitori protonske pumpe (omeprazol, lanzoprazol,

pantoprazol, esomeprazol itd.) (85, 104, 107, 110). Primjenjuju se 4 do 8 tjedana, a ako nije došlo do značajnog poboljšanja, razmatra se 3. stupanj terapije. Rizici eventualne višegodišnje terapije nisu u djece još jasno definirani.

Treći stupanj terapije GERB-a jest operativni zahvat. Preporuča se Nissenova fundoplikacija čiji je uspjeh od 57% do 92% slučajeva (110). Mortalitet operacije iznosi od 0 do 4,7%, što upućuje na oprez kod postavljanja indikacije za operativno liječenje (104). Operativni zahvat je indiciran u bolesnika kod kojih medikamentoznom terapijom nije došlo do poboljšanja simptoma respiratornog sustava (učestale aspiracije), u slučajevima trajnih smetnji u smislu retrosternalne boli, orofaringealne komplikacije, laringealne i ezofagealne komplikacije (peptičke strikture, Barrettov ezofagus) i kod striktura, kad je operacija ujedno i jedino moguće liječenje. Slabiji uspjeh je u retardiranih osoba, a nije uspješna kod malformacija jednjaka.

1. 2. 8. Prognoza GERB-a

U dostupnoj literaturi malo je opisanih prospektivnih istraživanja GERB-a. Podatci govore da u ranoj dojenačkoj dobi njih 40% imaju simptome bolesti u dobi od 6 mjeseci, a oko 20% u dobi od godinu dana (89). U adultnoj medicini GERB je u porastu, a posljedično tome veća je incidencija Barrettovog jednjaka (metaplazije pločastog u kubični i cilindrični epitel – prekancerozne promjene), odnosno adenokarcinoma jednjaka. Iste se komplikacije sve češće opisuju i u djece, a ima i opisa adenokarcinoma jednjaka u ovoj životnoj dobi (87, 89, 111). Waring i suradnici su, uspoređujući simptome GERB-a u djece i odraslih, postavili hipotezu da GER ne «nestaje», već se simptomi vjerojatno smiruju kroz neko razdoblje, da bi u odrasloj dobi ponovo došlo do izraženijih simptoma (89). Sve to upućuje na potrebu velikog opreza prilikom postavljanja dijagnoze GERB-a u dječjoj dobi te postavlja visoku razinu odgovornosti glede liječenja i praćenja tog, donedavno nepoznatog entiteta, koji se još i danas često podcjenjuje.

1. 2. 9. GER i astma

U djece s astmom značajni GER može se naći u 30-80% slučajeva. Zadnjih desetljeća medicinska literatura obiluje izvještajima o mnogobrojnim kliničkim istraživanjima

GER-a u astmatičnih bolesnika (112,113). Dvije su temeljne pretpostavke za objašnjenje astme u osoba s refluksnom bolešću: a) astma nastaje zbog bronhospazma nakon aspiracije refluktiranog želučanog sadržaja u traheju; b) bronhospazam je posljedica vagalnih refleksa stimuliranih receptorima u sluznici jednjaka niskim pH i distenzijom. Moguće je, međutim, da su u patofiziološkim procesima važna oba mehanizma, ali različito izražena u određenog bolesnika.

Karakteristični (ali ne uvijek i svi prisutni) nalazi u bolesnika s astmom induciranom refluksom jesu: češća pojava bolesti u odrasloj dobi, u nepušača i u osoba bez alergijskih smetnji, prisutnost kašlja, pogoršanje kod hranjenja, neadekvatan odgovor na antiastmatičnu terapiju i povoljan odgovor na primjenu antisekretolitika. Pojava astmatičnih napadaja pretežno noću simptom je od izuzetnog značenja. Naime, vodoravni položaj tijela, smanjenje izlučivanja sline i smanjena frekvencija gutanja pogoduju prolongiranoj izloženosti jednjaka želučanoj kiselini. Na taj se način, ezofagitis pojavljuje češće i intenzitet mu je jači; ezofagitis je značajni čimbenik u nastanku bronhospazma provociranog refluksom. Osim toga, noćni se refluks pojavljuje u vrijeme povećane osjetljivosti dišnog sustava zbog smanjene aktivnosti protektivnih refleksa, zbog ograničenih rezervi kisika u plućima i zbog sniženog praga normalne podražljivosti respiracijske muskulature.

Na refluksnu bolest treba misliti u svih bolesnika a astmom, pri čemu treba imati na umu da GER kod nekih može biti „tih“ ili se može očitovati ekstraefagealnim simptomima kao što su kronični kašalj, laringitis ili ponavljajuće plućne infekcije.

Brojna klinička iskustva potvrđuju da liječenje refluksne bolesti poboljšava simptome astme te ujedno smanjuje i skraćuje potrebu lijekova u njenom liječenju, dok postoje i oprečni stavovi, za sada samo istraženi u odraslih bolesnika (113). Usprkos svemu navedenom, potrebno je istaknuti da se astma inducirana refluksnom bolešću u većine bolesnika može pretpostaviti, ali ne i dokazati. Današnje dijagnostičke metode, iako tehnološki uznapredovale, još su uvijek nedovoljno pouzdane. Stoga će i u budućnosti veza između GER-a i astme biti predmetom mnogobrojnih rasprava. (112).

1. 3. NEINVAZIVNA DIJAGNOSTIKA PLUĆNIH BOLESTI

Izravna procjena upale u dišnim putovima primjenom do sada poznatih načina dobivanja ispitivanog uzorka, npr. bronhoskopijom, invazivan je i neugodan postupak, pogotovo za djecu. Poluinvazivan postupak dobivanja uzorka, inducirani iskašljaj (inhalacija hipertonične otopine soli), također je ograničene primjenjivosti u dječjoj dobi, uz rizik za moguće pokretanje „pritajene“ upale ili pak bronhospazam koji se očituje kod 14% postupaka indukcije iskašljaja u djelomično kontroliranoj astmi i 25% postupaka indukcije u nekontroliranoj astmi (114). Ograničavajući čimbenik kod upotrebe iskašljaja kao uzorka je i vrijeme (potrebno je oko 2 sata za njegovo dobivanje). U dosadašnje preporuke o astmi nije uključeno praćenje upale, već samo kontrola bolesti po simptomatologiji (12), iako je dokazano da definiranje prirode, stupnja i intenziteta upale poboljšavaju kontrolu bolesti (115). Također je važno naglasiti da ispitivanja upalnih medijatora u plazmi i mokraći kod astmatičara odražavaju sistemsku, a ne lokalnu upalu u plućima.

Iako su inducirani iskašljaj i bronhoalveolarni ispirak relativno dobri uzorci za ispitivanje različitih biokemijskih pokazatelja u plućnim bolestima, ograničeno se ispituju zbog invazivne prirode postupka njihova dobivanja. Upravo zbog toga već se duži niz godina „traže“ manje invazivni, odnosno neinvazivni postupci za dobivanje odgovarajućih uzoraka za ispitivanje, pa se danas već u svakodnevnom radu primjenjuje analiza izdaha (dišni testovi), a intenzivno se provode istraživanja kondenzata izdaha (*Exhaled Breath Condensate*, EBC) .

Tzv „dišni testovi“ već stoljećima su poznati u medicinskim krugovima (npr. dijabetička ketoacidoza – zadržak po acetonu; uremijska koma – zadržak po mokraći). Vodikov izdisajni test koristi se u gastroenterološkoj dijagnostici unatrag tridesetak godina, u ispitivanju intolerancije laktoze, nedostatku disaharidaza, otkrivanju intestinalne malapsorpcije fruktoze i ostali. Postoje također i testovi koji uključuju peroralno ili intravensko davanje spojeva obilježenih s C13, dišni testovi za ispitivanje funkcije jetre uz primjenu obilježenih lijekova, masnih kiselina ili ugljikohidrata te dišni testovi ispitivanja anorganskih hlapljivih spojeva, odnosno plinova (npr. NO, CO) u izdahu (116). Bolesnici sa cirozom jetre imaju, zbog promijenjenog metabolizma

metionina, u izdahu povećane vrijednosti metil-merkaptana, etil-merkaptana i dimetil-sulfida.

Usprkos brojnim prednostima neinvazivnih dišnih testova, neki od njih (prvenstveno kondenzat izdaha) u svakodnevnoj se praksi ne primjenjuju jer još uvijek nisu dovoljno standardizirani u analitičkom smislu niti validirani u kliničkoj praksi.

Neinvazivni postupci dobivanja uzorka primjenjivi su u dječjoj dobi, kod bolesnika s teškim oblicima bolesti i onima na potpomognutoj ventilaciji, a također se mogu primjenjivati u ambulantni i kod kuće. Analiza tih uzoraka omogućuje longitudinalno praćenje bolesti, pomaže u diferencijalnoj dijagnostici plućnih bolesti, procjeni težine bolesti, odgovoru na terapijski postupak te daje uvid u kinetiku bolesti. Analize uzoraka dobivenih neinvazivnim postupcima većinom su u istraživačkom postupku, međutim, sve je više dokaza o njihovoj budućoj ulozi u dijagnostičkom postupku različitih plućnih bolesti (KOPB, cistična fibroza, astma, cilijarna diskinezija) (14, 117-120).

Predviđa se da će u dijagnostičkom postupku ovi uzorci u većini slučajeva zamijeniti bronhoalveolarni ispirak i dijelom inducirani iskašljaj. Unatrag nekoliko godina došlo je do prave eksplozije zanimanja za neinvazivne dišne testove u plućnim bolestima, odnosno za analizu sastojaka kondenzata izdaha. Neinvazivni postupci skupljanja i dobivanja uzoraka za dišne testove uključuju skupljanje izdaha i kondenzata izdaha.

1. 3. 1. Izdah

Izdah čovjeka sastoji se od plinovite faze s hlapljivim spojevima (ugljikov oksid, dušikov oksid) i vodene faze koja se uglavnom sastoji od vodene pare i nekih nehlapljivih aerosolskih čestica iz donjeg dijela dišnog sustava. Tekućina koja oblaže donje dišne putove sastoji se od oko 200 hlapljivih i nehlapljivih spojeva (proteini, lipidi, oksidansi itd.) (5, 9). Do sada je od plinovitih sastojaka izdaha najviše ispitano značenje promjena dušikovog oksida u izdahu, kojeg stvara nekoliko tipova stanica u plućima (upalne, epitelne, endotelne). Danas je standardizirano mjerenje $F_{E\text{NO}}$ cjelovit neinvazivan način praćenja upale u dišnim putovima u astmi (121). Ova dijagnostička metoda našla je svoje mjesto u dijagnostici i terapiji alergijskih bolesti kao brz i jednostavan pokazatelj alergijske upale u dišnim putovima, te kao marker za

praćenje učinka protuupalne i inhalacijske terapije, kako u astmi, tako i kod alergijskog rinitisa.

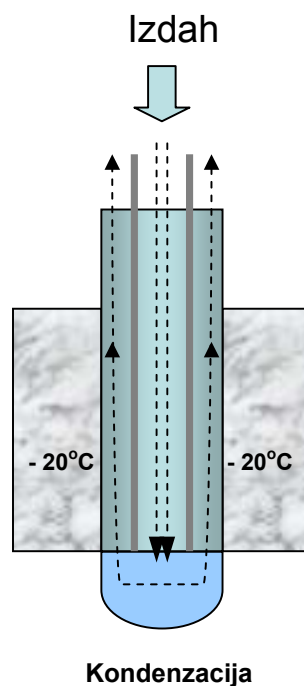
1. 3. 2. Kondenzat izdaha

Za sada još uvijek nije poznato podrijetlo sadržaja kondenzata izdaha, kao niti točan mehanizam njegova nastanka, međutim, pretpostavlja se da vrtloženje zraka za vrijeme disanja igra važnu ulogu u nastanku aerosola. Dakle, iako se veći dio kondenzata izdaha sastoji od vodene pare, ostatak sadrži i aerosolske čestice iz donjeg dijela dišnog sustava. Iako malobrojni, postoje dokazi koji upućuju na transport nehlapljivih spojeva donjeg dišnog sustava u obliku aerosola u izdah (5). Za vrijeme mirnog (tidalnog) disanja broj aerosolskih čestica je između 0,1 i 4 čestice na cm^3 , a srednji promjer čestica je manji od $0,3 \mu\text{m}$ (122). Broj nastalih čestica ovisi o trenutnoj brzini protoka zraka i površinskog tlaka izvanstanične tekućine koja oblaže donji dišni sustav. Turbulentni tijek i velik broj bridova u točkama grananja dišnih putova mogu olakšati stvaranje aerosola (123-125).

Prva ispitivanja skupljanja i analize kondenzata izdaha provedena su još 1980. god. u Rusiji (126), hlađenjem zraka u kolektoru jednostavne izrade, koji je imao mnogo nedostataka. Danas je postupak sakupljanja kondenzata izdaha brzo i jednostavno, zahvaljujući komercijalno dostupnom kolektoru kondenzata, tzv. *EcoScreen* tvrtke Jaeger-Toennis, Hoechberg, Njemačka ili kolektorima drugih proizvođača.

1. 3. 2. 1. Uzorkovanje kondenzata izdaha

Dobivanje kondenzata izdaha zahtijeva hlađenje zraka koje rezultira kondenzacijom. Postupak dobivanja uzorka kondenzata izdaha je sljedeći: bolesnik diše mirno preko usnika kroz cijev u kojoj su odvojeni udahnuti i izdahnuti zrak (Slika 3). Za vrijeme izdisanja zrak prolazi kroz lamelarni kondenzor koji se hladi na 0°C , -10°C ili -20°C (ovisno o proizvođaču), a kondenzat se skuplja u rashlađeni spremnik. U tijeku 10 -15 minuta, koliko traje uzorkovanje, dobije se oko 2 - 4 mL kondenzata izdaha.



Slika 3. Shematski prikaz uzorkovanja kondenzata izdaha

Niska temperatura važna je zbog labilnosti pojedinih biljega upale (npr. lipidnih medijatora upale). Skupljeni kondenzat potrebno je, ovisno o biljegu koji će se odrediti, analizirati odmah, pohraniti na odgovarajućoj temperaturi oko -70°C ili liofilizirati. S modificiranom opremom kondenzat izdaha je moguće skupiti i kod novorođenčadi. Kontaminacija slinom može uzrokovati probleme, ali se može lako otkriti određivanjem katalitičke aktivnosti amilaze. Kod današnjih kolektora taj problem više ne postoji. Potrebno je također naglasiti da je tekućina u kondenzatu izdaha razrjeđenija nego li in vivo. Stupanj razrjeđenja kondenzata izdaha je vrlo velik (oko 10000 - 20000 puta (127). Budući da su kondenzirajuće komore načinjene od stakla, polistirena ili polipropilena, a zbog njihovih različitih adhezijskih svojstava, sastav kondenzata izdaha može biti izmijenjen. Minutna ventilacija ostaje glavna odrednica količine kondenzata, a nema veći utjecaj na vrijednosti izmjerenih spojeva u kondenzatu (128). Također postoje kolektori kojima se kondenzat izdaha može skupljati i u kućnim uvjetima, a uzorak se potom dostavlja u laboratorij za analizu. Prednost takvih

kolektora je da omogućuju da se uzorak dobije u vrijeme akutnog pogoršanja bolesti pa liječnik može pratiti učinak primijenjene terapije. Njihov je nedostatak što nema nadzora stručnog medicinskog osoblja nad skupljanjem uzorka.

1. 3. 2. 2. Analiza kondenzata izdaha

Budući da plućne bolesti imaju različitu histološku, pa prema tome i različitu biokemijsku sliku, u ispitivanju kondenzata izdaha kod svake od njih ispituju se različiti biokemijski biljezi. Uglavnom su usmjerena na ispitivanje pokazatelja oksidativnog stresa i upale. Do sada je u kondenzatu izdaha dokazana prisutnost ili povećane koncentracije različitih biokemijskih biljega, primjerice: pH, vodikov peroksid, nitrotirozin, nitrati/nitriti, eikozanoidi (prostaglandin E₂, leukotrijen B₄, leukotrijen C₄, leukotrijen D₄ i dr.) te izoprostani, (posebice 8-izoprostani) (171) i dr. Najviše su ispitivane promjene biokemijskih biljega upale i oksidacijskog stresa, u kondenzatu relativno malih skupina bolesnika s astmom (130,131), KOPB (132), cističnom fibrozom (133), karcinomom pluća (134), a manje drugih bolesti pluća .

Ispitivanja biljega u kondenzatu izdaha odnose se najvećim dijelom na bolesnike s astmom, na pušače, na bolesnike s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti (KOPB), cističnom fibrozom, bronhiektijazama, profesionalnim oboljenjima, akutnim respiratornim distres sindromom i s karcinomom pluća (135). Lista novootkrivenih makromolekula kondenzata izdaha, koje odražavaju patobiokemijske promjene u donjem dijelu dišnog sustava neprestano se povećava.

U plućima ima malo željeza, od kojeg se većina nalazi intracelularno u alveolarnim makrofagima, a samo petina u tekućini koja oblaže dišne putove (136). Željezo je BAL-u u obliku transferina, laktoferina i feritina, a tzv. «slobodno» željezo vezano je uglavnom za nespecifičan protein albumin ili za spojeve male molekularne mase (137). «Slobodno» željezo može potaknuti oksidativno oštećenje jer katalizira generaciju reaktivnih hidroksilnih radikala (138, 139). Transferin dopijeva u BAL transudacijom iz plazme ali i lokalnom sintezom (137), a laktoferin potječe uglavnom iz dišnih putova a manje iz alveola (137). Vezanje željeza na transferin i laktoferin sprječava stvaranje hidroksilnih radikala. Feritin, služi kao privremeno spremište

željeza (antioksidacijski učinak), odnosno kao izvor željeza – kada u prisustvu superoksidnog aniona može pokrenuti tvorbu toksičnih hidroksilnih radikala) (137).

Magnezij djeluje na relaksaciju bronhalnih glatkih mišića (140) , što je u skladu sa činjenicom da djeluje kao antagonist kalcija, koji je bronhokonstriktor (141, 142).

1. 3. 2. 3. Prednosti i nedostatci analize kondenzata izdaha

Dosadašnja straživanja nesumnjivo su pokazala da analiza može pomoći kod ranog otkrivanja patoloških promjena, u definiranju težine plućne bolesti, praćenja bolesti, predviđanja egzacerbacija, te moduliranju terapije plućnih bolesti. Brojne su prednosti analize uzorka kondenzata izdaha: jednostavno dobivanje, reproducibilnost, mogućnost uzorkovanja u kućnim uvjetima, neinvanzivnost postupka, mogućnost longitudinalnih ispitivanja i dr.). Analiza kondenzata izdaha je metoda sa značajnim prednostima za praćenje medijatora upale u odnosu na analizu bronhoalveolarnog ispirka ili sputuma. Predstavlja novi, lako izvediv i ponovljiv način dijagnostike plućnih bolesti te je potpuno neinvazivna. Odražava promjene kao i tradicionalni uzorci (BAL, sputum). Ne postoji značajan dilucijski čimbenik kakav postoji kod bronhoalveolarnog ispirka. Prikladna je za sve dobne skupine, može se uzimati kod svjesnih, spontanodišućih bolesnika, novorođenčadi i bolesnika na strojno potpomognutoj ventilaciji, kod kojih nije moguće dobiti bronhoalveolarni ispirak ili inducirani iskašljaj. Također je prikladna za praćenje progresije, kao i za praćenje terapijskog učinka na određenu plućnu bolest.

Područje ispitivanja kondenzata izdaha još je uvijek na razini istraživanja, a ne na razini kliničke primjene zbog brojnih nedostataka same metode: nestandardiziranosti uzorkovanja, nepoznatog anatomske specifičnog mjesta podrijetla sastojaka kondenzata, nepostojanja dokaza o podrijetlu aerosolskih čestica (bronhi/terminalni dišni putovi), mogućnosti koncentracijskog artefakta zbog evaporacije uzorka prije kondenzacije, obrade uzorka (zbog utjecaja sline i sadržaja iz gornjih dišnih putova), insuficijentnosti podataka o biljezima intersticijskih plućnih bolesti, zbog još uvijek nedefiniranih referentnih vrijednosti ispitivanih parametara (ne postoji jedinstven aparat za dobivanje kondenzata) te zbog kliničke validacije, odnosno uvođenja u svakodnevnu praksu dijagnostike i praćenja plućnih bolesti.

Prije upotrebe u kliničkoj svakodnevnici potrebno je:

- optimizirati i standardizirati
 - o način uzimanja,
 - o način pohrane i
 - o način obrade uzorka
 - o analitičke postupke određivanja biokemijskih biljega,
- definirati čimbenike koji utječu na rezultate njihova određivanja,
- odrediti referentne raspone,
- definirati njihovo dijagnostičko značenje za pojedinu plućnu bolest i
- usporediti njihovo značenje u odnosu na trenutne "zlatne standarde" u dijagnostici plućnih bolesti, te o
- odrediti njihovu ulogu u praćenju djelotvornosti primijenjene terapije (14, 15)

Očekuje se da će nakon potrebnih postupaka optimiziranja i standardizacije kondenzat izdaha postati metoda izbora u praćenju i dijagnostici plućnih bolesti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična alergijska upala jedno je od osnovnih obilježja astme. Pronalaženje pokazatelja lokalne upale moglo bi dodatno pomoći u definiranju jačine upale, a u konačnici omogućiti praćenje učinka primijenjene protuupalne terapije.

Praćenje koncentracije upalnih pokazatelja u serumu ne može precizno definirati intenzitet upale u pojedinim organskim sustavima, jer su njihove vrijednosti u serumu odraz zbivanja u cijelom organizmu. Procjena upale u dišnim putovima moguća je analizom uzoraka dobivenih u tijeku bronhoskopije (aspirat, biopat, bronhoalveolarni ispirak), ali se radi o uzorcima uzorkovanim na neugodan i invazivan način, osobito u dječjoj dobi. Uzorkovanje inducirano iskašljaja je poluinvazivan postupak, a i vrijeme potrebno za dobivanje dovoljne količine uzorka za analizu također je ograničavajući činitelj.

Veliki je napredak u praćenju upale i oksidacijskog stresa u dišnim putovima postignut analizom izdaha, odnosno određivanjem plinovitih sastojaka - koncentracije dušikovog oksida i vodikovog peroksida u izdahnutom zraku, čemu je pridonijela primjena standardiziranih analizatora u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Određivanje dušikovog oksida i vodikovog peroksida u izdahu pomaže u diferencijalnoj dijagnostici plućnih bolesti, procjeni težine bolesti, te odgovoru na primijenjenu terapiju.

Uzorkovanje aerosolizirane ekstracelularne tekućine iz pluća, omogućeno je primjenom standardiziranih kolektora kondenzata izdaha. Međutim analiza kondenzata izdaha još uvijek je u istraživačkoj fazi, pa je svaki objavljeni rezultat koristan prilog na putu odabira tipičnih biomarkera za pojedine patološke procese odnosno bolesti, odabira standardiziranih predanalitičkih i analitičkih postupaka, a u konačnici uvođenja analize kondenzata izdaha u svrhu diferencijalne dijagnoze i longitudinalnog praćenja bolesnika odnosno individualiziranja terapije.

2. 1. Hipoteza

Lokalna alergijska upala i oksidacijski stres u plućima odnosno bronhokonstrikcija mogu se mjeriti objektivnim pokazateljima. Lokalnu upalu moguće je pratiti određivanjem $F_{E}NO$ u izdahu te određivanjem pH u kondenzatu izdaha, oksidacijski

stres mjerenjem H_2O_2 u izdahu te koncentracije željeza u kondenzatu izdaha, a stupanj bronhokonstrikcije/relaksacije mjerenjem koncentracije kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha.

Može se pretpostaviti da će određivanje pH, željeza, kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha pomoći u razlikovanju astme i GERB-a. Dobivene vrijednosti korelirale bi se s vrijednostima F_{ENO} u izdahahu te parametrima plućne funkcije.

Postavljena je hipoteza:

1. vrijednosti biljega upale, oksidacijskog stresa i bronhokonstrikcije u kondenzatu izdaha statistički se značajno razlikuju u djece s astmom i djece kontrolne skupine
2. vrijednosti biljega upale, oksidacijskog stresa i bronhokonstrikcije u kondenzatu izdaha izdaha statistički se značajno razlikuju u djece s GERB-om i djece kontrolne skupine
3. vrijednosti biljega upale, oksidacijskog stresa i bronhokonstrikcije u kondenzatu izdaha statistički se značajno razlikuju u djece s astmom i djece s GERB-om.
4. vrijednosti biljega upale, oksidacijskog stresa i bronhokonstrikcije u kondenzatu izdaha su u korelaciji s vrijednostima F_{ENO} u izdahu te parametrima plućne funkcije.

2. 2. Ciljevi

Cilj je ovog istraživanja odrediti komparativne vrijednosti pH, željeza, kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha djece s astmom, djece s GERB-om i djece kontrolne skupine. Astma je odabrana kao najčešća kronična upalna bolest dišnog sustava, a GERB zbog toga što se katkad simptomi bolesnika s GERB-om mogu pogrešno pripisati astmi, što može imati za posljedicu neadekvatan terapijski pristup. Vrijednosti pH odabrane su radi ispitivanja kiselog stresa u djece s astmom. Smanjene vrijednosti pH tekućine koja oblaže alveole uzrok su brojnih patoloških procesa koji dovode do pojave simptoma astme, prvenstveno bronhokonstrikcije. Održavanje homeostaze željeza u plućima važno je za održavanje ravnoteže između oksidativnih i antioksidativnih procesa unutar dišnog sustava. Kalcij i magnezij ključni su ioni u bronhokonstrikciji odnosno relaksaciji mišića bronha.

Specifični ciljevi su:

1. Usporediti vrijednosti odabranih biomarkera kod djece s astmom i djece s GERB-om,
2. Odrediti koncentraciju $F_{E}NO$ u izdahu kod djece s astmom i djece s GERB-om,
3. Ispitati razliku u koncentraciji pojedinih biomarkera u djece s astmom i djece s GERB-om u odnosu na kontrolnu skupinu,
4. Ispitati korelaciju između odabranih biomarkera iz kondenzata izdaha ispitivanih skupina s koncentracijom $F_{E}NO$ u izdahu, parametrima plućne funkcije (FEV_1 , FVC, MEF_{25} , MEF_{50} , MEF_{75} , PEF),
5. Odrediti dijagnostičku vrijednost određivanja odabranih biomarkera.

Rezultati ovog istraživanja mogli bi pomoći u razumijevanju posljedica upalnih procesa nastalih zbog različitih uzroka (alergijska upala, gastroezofagealni refluks) te tako utjecati i na mogućnost individualizacije terapije kod djece s astmom odnosno GERB-om. Mogući odabir biomarkera kondenzata koji najbolje korelira s ostalim *in vivo* i *in vitro* pokazateljima, pomogao bi u predviđanju, diferencijalnoj dijagnostici, praćenju progresije bolesti i učinku terapije na tijek bolesti. Osobit doprinos može se očekivati u svakodnevnoj kliničkoj praksi, pa i u longitudinalnim istraživanjima u području pedijatrijske pulmologije u kojoj nedostaju odgovarajući uzorci za neinvazivno ispitivanje bolesnika, što čini predloženu temu doktorske disertacije vrijednim i originalnim doprinosom.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3. 1. ISPITANICI I METODE

3. 1. 1. Ispitanici

Ispitanici, djeca i adolescenti u dobi od 5 – 16 godina, obrađivani su u razdoblju od svibnja 2006. do prosinca 2008. godine. Svrstani su u tri skupine:

I. skupina: djeca s alergijskom astmom, N = 59, u dobi od 5 – 16 godina ($\bar{x} \pm SD = 10 \pm 3$), prethodno kontrolirana i praćena u Dječjoj bolnici Srebrnjak.

Djecu je, zbog simptoma kašlja i otežanog disanja unatrag nekoliko mjeseci, u Dječju bolnicu Srebrnjak prvi put uputio nadležni pedijatar radi alergološke obrade i postavljanja konačne dijagnoze. Po dolasku u bolnicu, svakom je djetetu uzeta anamneza (u kojoj postoji podatak u pozitivnoj atopiji u obitelji) i učinjen kompletan klinički pregled, u kojem je auskultacijskim nalazom na plućima utvrđeno postojanje opstrukcije bronha određenog stupnja, a izmjerene vrijednosti parametara vitalnih funkcija (frekvencija disanja i pulsa, saturacija krvi kisikom) bile su u granicama normale za dob. Potom su uslijedili kliničko-laboratorijski dijagnostički postupci. Kod svakog djeteta kožnim ubodnim (*prick*) testom utvrđena je alergijska preosjetljivost na jedan ili više inhalacijskih alergena (grinje, pelud trava, stabala i korova, perje, dlake životinja) te također *in vitro* testovima, koji su pokazali povećane vrijednosti ukupnih IgE protutijela i specifičnih IgE protutijela na jedan ili više inhalacijskih alergena. Plućnim funkcijskim testom (spirometrija) djeci je utvrđeno postojanje opstruktivnih promjena na velikim i malim dišnim putovima te je potom učinjenim bronhodilatacijskim testom (Ventolinski test) došlo do porasta vrijednosti forsiranog ekspiracijskog volumena u prvoj sekundi (FEV1) za 12% i više, što je ukazivalo na reverzibilnost bronhoopstrukcije. Svim navedenim testovima kod ove skupine djece postavljena je dijagnoza alergijske astme. Uvedena im je profilaktička terapija s ICS u dnevnoj dozi od 50 do 200 µg (ovisno o dobi, trajanju i težini simptoma), koje su uzimali inhalacijom, bilo putem pumpice (MDI, *metered dose inhaler*) ili preko diskusa (DPI, *dry powder inhaler*). Sva su ova djeca redovito praćena i kontrolirana u Dječjoj bolnici Srebrnjak, redovito su uzimala preporučenu profilaksu najmanje 3mjeseca, a

najviše 6 mjeseci prije pojave prve akutne egzacerbacije, kada su ponovno pregledani u hitnoj ambulanti Bolnice, te uključeni u ispitivanu skupinu.

Djeca su došla u hitnu ambulantu sa simptomima kašlja i otežanog disanja (bez febriliteta), koji su trajali najviše tri dana prije dolaska, unatoč redovitom uzimanju profilaktičke terapije. Kod kuće su najviše 24 sata prije dolaska uzeli jednom do triput β -2 agonist kratkog djelovanja (*Ventolin*), s time da ih je u međuvremenu pregledao nadležni pedijatar, koji im nije ordinirao parenteralni ili peroralni kortikoid, nego je preporučio uzimanje Ventolina bez povećanja doze ICS-a. Po dolasku uzeta je detaljna anamneza i heteroanamneza, učinjen klinički pregled, izmjereni su parametri vitalnih funkcija: frekvencija disanja (5 - 8 godina: $> 40/\text{min}$, iznad 8 godina $>20/\text{min}$), frekvencija pulsa (5-8 godina $>100/\text{min}$, iznad 8 godina $>80/\text{min}$), saturacija krvi kisikom (SatO_2 : $< 94\%$). Osnovnom laboratorijskom obradom (kompletna krvna slika, diferencijalna krvna slika, C-reaktivni protein) isključeno je postojanje akutne infektivne bolesti. Djeci je potom učinjena spirometrija, frakcija izdahnutog dušičnog oksida ($F_{\text{E}}\text{NO}$) te im je uzet kondenzat izdaha. Nakon provedene dijagnostičke obrade djeca su, ovisno o težini agzacerbacije, puštena kući s odgovarajućom simptomatskom terapijom ili su zadržana na bolničkom liječenju.

Kriteriji uključivanja:

1. Dijagnoza alergijske astme, (pozitivan ventolinski test, dokaz alergijske preosjetljivosti *in vivo* i *in vitro* testovima),
2. unatrag najmanje tri mjeseca redovita profilaksa ICS,
3. Egzacerbacija, izazvana virusom ili alergenom.

Kriteriji neuključivanja:

1. Bolesnici u remisiji (kontrolirana astma),
2. Djeca mlađa od 5 godina,
3. Postojanje popratne bolesti (pneumonija, atopijski dermatitis, alergijski rinitis, vitalno ugroženi)

II. skupina: djeca s GERB-om, $N = 75$, u dobi od 5 – 16 ($\bar{x} \pm \text{SD} = 11 \pm 3$), liječena u Dječjoj bolnici Srebrnjak.

Djecu je, zbog simptoma kašlja i bez simptoma infektivne bolesti, u Dječju bolnicu Srebrnjak uputio nadležni pedijatar radi postavljanja konačne dijagnoze. Podrobna anamneza uzeta je od djece odnosno roditelja, te je učinjen detaljan klinički pregled. Izmjereni parametri vitalnih funkcija bili su u granicama normale za dob. Osnovnom laboratorijskom obradom (kompletna krvna slika, diferencijalna krvna slika, C-reaktivni protein) isključeno je postojanje akutne infektivne bolesti. Alergološkom obradom (alergološko testiranje, spirometrija, F_{ENO}) kod ove djece isključeno je postojanje alergijske astme te im je dodatno učinjeno 24-satno mjerenje gastroezofagealne vrijednosti pH (24-satna pH-metrija jednjaka, $pH < 7,4$ pH-jedinice), čime je postavljena konačna dijagnoza GERB-a. Po postavljenoj dijagnozi GERB-a ovoj je djeci također uzet kondenzat izdaha. Djeca su potom opuštena kući s odgovarajućom terapijom.

Kriteriji uključivanja:

1. kašalj u trajanju duljem od mjesec dana,
2. dispeptične tegobe (podrigivanje, žgaravica, bol u području iza prsne kosti),
3. parametri 24-satne pH-metrije (broj refluksnih epizoda, broj refluksnih epizoda duljih od 5 minuta, indeksi *Boix-Ochoa* i *De Meester Johnson*) izvan referentnih intervala, odnosno dokazan GERB (143)

Kriteriji neuključivanja:

1. atopija u obitelji
2. djeca mlađa od 5 godina
3. Postojanje popratne bolesti (rinitis, pneumonija)

III. kontrolna skupina, $N = 30$, u dobi od 6 – 14 godina ($\bar{x} \pm SD = 10 \pm 2$), dobrovoljci iz jedne zagrebačke osnovne škole. Radilo se o zdravoj djeci s obiteljskom anamnezom neopterećenom kroničnim i atopijskim bolestima te s urednom osobnom anamnezom. Po dolasku u bolnicu, navedenoj djeci uzeta je anamneza i učinjen kompletan klinički pregled, kojim je utvrđeno da nemaju kliničkih znakova akutne bolesti, a izmjereni parametri vitalnih funkcija (frekvencija disanja i pulsa, saturacija krvi kisikom) bili su u granicama normale za dob. Uključena djeca prethodnih mjesec

dana nisu bila bolesna, niti su imala neku kroničnu bolest. Ovoj skupini djece također je učinjena spirometrija, $F_{E}NO$ te potom uzet kondenzat izdaha.

Kriteriji uključivanja:

1. klinički zdrava djeca
2. negativna anamneza glede atopije i GER-a
3. frekvencije disanja i pulsa, saturacija krvi kisikom unutar referentnih intervala
4. spirometrijski parametri unutar referentnih intervala
5. $F_{E}NO$ unutar referentnih intervala

Kriteriji neuključivanja:

1. atopija u obitelji,
2. dispeptične tegobe (podrigivanje, žgaravica, bol u području iza prsne kosti),
3. postojanje popratne bolesti (rinitis, pneumonija).

Kriteriji isključivanja za sve ispitivane skupine djece bili su jednaki:

1. Premali uzorak kondenzata izdaha ($<1,5$ mL).
2. Nesuradnja pacijenta, kašalj pri izvođenju dijagnostičkih metoda (spirometrija)
3. odustajanje na vlastiti zahtjev djeteta/roditelja.

Etičko povjerenstvo bolnice, te Ministarstvo znanosti obrazovanja i športa RH odobrili su ovo istraživanje. Roditelji svakog od djece iz tri ispitivane skupine potpisali su informirani pristanak.

3. 1. 2. Metode

3. 1. 2. 1. Ispitivanje plućne funkcije

Plućna funkcija mjerena je u djece koja su mogla surađivati (u dobi ≥ 5 godine). Korišten je spirometar Jaeger MS BB/IOS system (Jaeger, Würzburg, Njemačka), a određeni su sljedeći parametri:

FVC - forsirani vitalni kapacitet

FEV₁ - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

MEF₂₅ - forsirani ekspiratorni protok pri 25% FVC

MEF₅₀ - forsirani ekspiratorni protok pri 50% FVC

MEF₇₅ - forsirani ekspiratorni protok pri 75% FVC

PEF - najveći ekspiratorni protok (vršni protok)

Dobivene vrijednosti uspoređene su s referentnim vrijednostima utvrđenim u Laboratoriju za ispitivanje plućne funkcije Dječje bolnice Srebrnjak u Zagrebu.

3. 1. 2. 2. Određivanje izdahnutoga dušičnog oksida

Izdahnuti dušični oksid (NO) izmjeren je pri protoku izdahnutog zraka od 50 mL/s, primjenom kemiluminiscetnog analizatora (NiOx analizator, Aerocrine, Stockholm, Švedska). Frakcija izdahnutog dušikovog oksida (F_ENO) biljeg je za određivanje stupnja alergijske upale u dišnim putovima. Referentne vrijednosti za djecu do 12 godina starosti su 5 - 15 ppb, a za starije od 12 godina 5 - 20 ppb.

3. 1. 2. 3. Određivanje 24-satnog pH jednjaka

Mjerenje gastroezofagealne vrijednosti pH (24-satna pH-metrija jednjaka) učinjeno je pomoću aparata Medtronic (Medtronic Functional Diagnostics, Skovlunde, Danska). Nakon očitavanja nalaza, uspoređivano je pet varijabli:

broj refluksnih epizoda,

refluksne epizode u trajanju duljem od 5 minuta,

refluksni indeks (RI),

Boix-Ochoa indeks i

Johnson-DeMeester indeks.

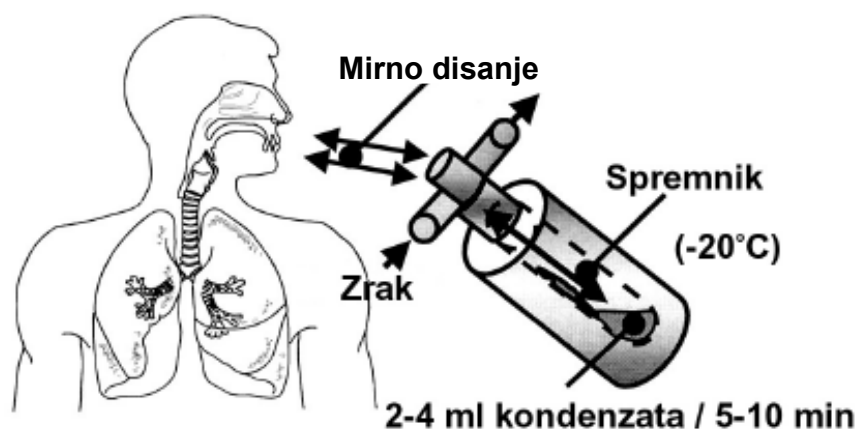
Zlatnim standardom za dijagnozu i procjenu kiselog refluksa smatra se 24-satno mjerenje kiselosti sadržaja u jednjaku, (24-satna pH-metrija jednjaka) (143).

3. 1. 2. 4. Kondenzat izdaha

3. 2. 4. 1. Uzorkovanje kondenzata izdaha

Kondenzat izdaha prikupljen je standardnom metodom (15) pomoću aparata EcoScreen (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Njemačka). Ispitanici su mirno disali na usta (uz nosnu štupaljku) tijekom 15 minuta. Izdisanjem zraka u rashlađeni spremnik

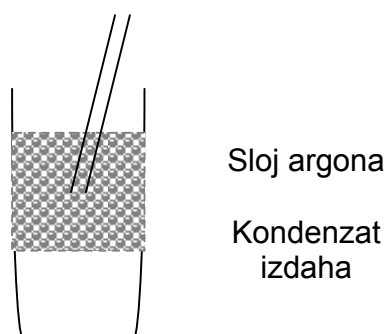
(-20°C) aparata EcoScreen tijekom 10 – 15 minuta može se dobiti oko 2 – 4 mL uzorka (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz uzorkovanja kondenzata izdaha (144)

3. 2. 4. 2. Nadslojavanje kondenzata izdaha argonom

Uzorak kondenzata izdaha nadslojen je s inernim plinom argonom (protok argona od 6 Lmin^{-1} kroz 2 minute) kako bi se izbjegao utjecaj ambijentalnih plinova (osobito CO_2) na pH vrijednost uzorka (Slika 5).



Slika 5. Argonizacija uzorka nadslojavanjem

3. 2. 4. 3. Određivanje pH, parcijalnog tlaka kisika i ugljika u kondenzatu izdaha

Parcijalni tlak kisika (pO_2), parcijalni tlak ugljičnog dioksida (pCO_2) i pH određeni su na analizatoru Ecosys II (EschweilerGmbH&Co. KG, Kiel, Njemačka), 3-5 minuta nakon uzorkovanja kondenzata izdaha. Aspiracijska kapilara za vrijeme aspiracije uzorka bila je uronjena tik do dna posudice s kondenzatom.

Odmah nakon određivanja pH dobiveni uzorak pohranjen je u hladnjak tijekom mjesec dana na $-80^{\circ}C$.

3. 2. 4. 4. Određivanje koncentracije željeza, kalcija i magnezija

Nakon odmrzavanja određene su koncentracije željeza, kalcija i magnezija, na automatskom selektivnom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan), uz primjenu reagensa istog proizvođača. Kalibracija metoda prilagođena je vrlo malim koncentracijama ovih elemenata u kondenzatu izdaha. Budući da je kondenzat izdaha razrijeđena otopina tekućine koja oblaže dišne putove, izračunavanjem omjera između magnezija i kalcija nastojalo se dobiti bolji uvid u preraspodjeli tih iona između staničnoga i izvanstaničnog prostora.

3. 2. 5. Statistička obrada

Pohrana podataka učinjena je u programu Excel 2000 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Za opis kvalitativnih varijabli korištene su tablice distribucije frekvencije, a kvantitativne varijable s normalnom raspodjelom opisane su aritmetičkom sredinom (\bar{x}), standardnom devijacijom (SD), a one s nenormalnom raspodjelom rasponom od najmanje do najveće vrijednosti, medijanom (M), te interkvartilnim rasponom (IQR). Testom homogenosti varijance (jednosmjerni test ANOVA) utvrđivalo se postoji li statistički značajna razlika među različitim skupinama ispitanika. Za usporedbu brojčanih podataka s normalnom raspodjelom primijenjeni su testovi t-Student, Kruskal-Wallis i ANOVA, a za usporedbu brojčanih podataka s nenormalnom raspodjelom testovi Mann-Whitney (U-test) i Wilcoxon. Vrijednosti $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima. ROC krivulja (*Receiver Operating*

Characteristic Curve) se primijenila za izračunavanje pokazatelja dijagnostičke valjanosti pojedinih testova. Za dobivene ROC-krivulje izračunata je vrijednost površine ispod krivulje AUC (*Area Under Curve*), kako bi se ustvrdila dijagnostička točnost navedenih testova za ispitivane skupine. Na apscisi ROC-krivulje prikazani su podatci 1-specifičnost, a na ordinati osjetljivost testa. Valjanost je označena s najvećom površinom ispod krivulje, koja podrazumijeva najveću osjetljivost i najveću specifičnost odnosno najveću diskriminacijsku snagu za određenu graničnu vrijednost (*cut off*). Idealni test imao bi površinu ispod krivulje 1,0 što znači da takav test uopće ne bi imao ni lažno pozitivnih ni lažno negativnih rezultata. Dogovoreni okvirni sustav vrednovanja dijagnostičke točnosti podrazumijeva sljedeće vrijednosti za AUC (Tablica 3):

Tablica 3. Razlikovna učinkovitost prema vrijednostima površine ispod ROC-krivulje (AUC)

AUC	razlikovna učinkovitost
0,50 do 0,60	nedovoljno dobra
0,61 do 0,70	dovoljno dobra
0,71 do 0,80	dobra
0,81 do 0,97	vrlo dobra
0,97 do 1,00	izvrsna

Izračunati su koeficijenti korelacije i učinjena je višestruka regresijska raščlamba. Vrijednost koeficijenta korelacije, (r), vrednovana je kako slijedi (145):

- $r = 0$ do $0,25$ (0 do $-0,25$): pokazuje da nema povezanosti,
- $r = 0,26$ do $0,50$ ($-0,26$ do $-0,50$): pokazuje neznatnu povezanost,
- $r = 0,51$ do $0,75$ ($-0,51$ do $-0,75$): pokazuje umjerenu do dobru povezanost,
- $r = 0,76$ do 1 ($-0,76$ do -1): pokazuje vrlo dobru do izvrsnu povezanost.

Istodobno je za koeficijent korelacije uzeta statistička značajnost, $p < 0,05$. Koeficijent korelacije koji nije ukazivao na povezanost uz statističku značajnost $p < 0,05$, znači da

ne postoji povezanost među ispitivanim varijablama jer je izračunati koeficijent korelacije, koji ukazuje na nepostojanje povezanosti, statistički značajan; i obratno ako je $p > 0,05$, koeficijent korelacije se ne smije tumačiti bez obzira na dobivenu vrijednost. Obrada podataka učinjena je u programu za statističku obradu MedCalc (Medisoftware, Mariakerke, Belgium).

4. REZULTATI

4. 1. Ispitanici

Ispitanici su pripadali ujednačenim dobnim skupinama ($p > 0,05$), ali su se statistički značajno razlikovale po spolu, $p = 0,0067$ (tablica 4). U skupini djece s astmom (prosječna dob $\bar{x} \pm SD = 10 \pm 3$ godina), bilo je više dječaka ($41/59 = 70\%$), a u skupini djece s GERB-om (prosječne dobi $\bar{x} \pm SD = 11 \pm 3$ godina), bilo je više djevojčica ($42/75 = 56\%$). U kontrolnoj skupini (prosječne dobi $\bar{x} \pm SD = 10 \pm 2$) bilo je 17 dječaka ($17/30 = 57\%$) te 13 djevojčica ($13/30 = 43\%$). Omjer muških prema ženskim bio je u djece s astmom 2,3 : 1, u djece s GERB-om i u djece kontrolne skupine 0,8 : 1.

Tablica 4. Prikaz ispitanika prema spolu.

	Astma	GERB	Kontrola
Dječaci, N (%)*	41 (70)	33 (44)	13 (57)
Djevojčice N (%)	18 (30)	42 (56)	17 (43)
Dob ($\bar{x} \pm SD$)	10 ± 3	11 ± 3	10 ± 2

* $\chi^2 = 10.007$, $df = 2$, $p = 0,0067$

4. 2. Plućna funkcija

Među pacijentima s astmom blagi stupanj bronhopneumonije ($FEV_1 = 60 - 80\%$, $FEV_1/FVC\% = 60 - 75\%$) imao je 31 ispitanik ($31/54 = 57\%$), srednji stupanj ($FEV_1 = 40 - 59\%$, $FEV_1/FVC\% = 40 - 59\%$) 18 ispitanika ($18/54 = 33\%$), a teški stupanj opstrukcije ($FEV_1 < 40\%$, $FEV_1/FVC\% < 40\%$) 5 ispitanika ($5/54 = 9\%$) (Tablica 4). U 89% ($49/55$) djece s GERB-om vrijednosti FEV_1 bile su veće od 80%, dok su u ostalih 11% ispitanika ($6/55$) vrijednosti FEV_1 bile u rasponu 60 – 80% ($FEV_1/FVC\% = 60 - 75\%$). Svi ispitanici kontrolne skupine imali su vrijednosti FEV_1 unutar referentnih intervala za dob. Testom χ^2 je utvrđeno da su se, temeljem rezultata plućne funkcije, ispitivane skupine statistički razlikovale ($p < 0,0001$).

Tablica 5. Rezultati mjerenja vrijednostima FEV1. Prikazana je razdioba djece - broj djece, N i postotak (%).

FEV1	Stupanj bronhoopstrukcije	Astma N (%)	GERB N (%)	Kontrola N (%)
> 80%	-	-	49/55(89)	22/22 (100)
60 – 80%	Blagi	31/54 (57)	6/55(11)	-
40 – 59%	Srednji	18/54(34)	-	-
< 40%	Teški	5/54 (9)	-	-

* $\chi^2=75,633$, df=4, p < 0,0001

Vrijednosti pokazatelja plućne funkcije prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Apsolutne vrijednosti parametara plućne funkcije u ispitanika.

		Astma	GERB	Kontrola
FVC (L)	Raspon	52 – 123	67 – 139	75 – 135
	$\bar{x} \pm SD$	87 \pm 13	-	
	Medijan	-	97	90
	IQR	-	88 – 102	83 - 99
FEV1 (L)	Raspon	46 - 143	66 - 136	82 - 113
	$\bar{x} \pm SD$	84 \pm 2	99 \pm 14	98 \pm 10
	Medijan	-	-	-
	IQR	-	-	-
MEF ₂₅ (L/s)	Raspon	21 – 177	23 – 202	66 – 199
	$\bar{x} \pm SD$	-	-	
	Medijan	64	87	93
	IQR	51 – 84	71 – 104	87 – 122
MEF ₅₀ (L/s)	Raspon	20 - 138	33 - 146	75 - 140
	$\bar{x} \pm SD$	73 \pm 26	92 \pm 22	99 \pm 18
MEF ₇₅ (L/s)	Raspon	25 - 132	43 - 143	75 - 117
	$\bar{x} \pm SD$	79 \pm 22	91 \pm 18	93 \pm 11
PEF (L/s)	Raspon	44 -124	63 - 137	66 - 115
	$\bar{x} \pm SD$	84 \pm 19	93 \pm 14	91 \pm 12
F _E NO (ppb)	Raspon	2,3 - 148,0	2,0 - 84,0	3,0 - 21,9
	$\bar{x} \pm SD$	-	-	9,6 \pm 5,3
	Medijan	23	10	-
	IQR	9,6 - 42,1	7,2 - 12,0	-

\bar{x} = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; IQR = interkvartilni raspon;

Djeca s astmom imala su statistički značajno manje vrijednosti svih parametara plućne funkcije u usporedbi s djecom kontrolne skupine djecom s GERB-om (Tablica 7).

Između skupine djece s GERB-om i kontrolne skupine nije postojala statistički značajna razlika niti za jedan od ispitivanih parametara.

Tablica 7. Statistička značajnost razlike između ispitivanih skupina za vrijednosti parametara plućne funkcije

p	FVC	FEV1	MEF ₂₅	MEF ₅₀	MEF ₇₅	PEF
Astma : Kontrola	0,0001	0,0009	<0,0001	<0,0001	0,0015	0,0419
GERB : Kontrola	0,0550	0,4060	0,0590	0,1303	0,4775	0,4718
Astma : GERB	0,0001	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0014	0,0026

4. 3. Izdahnuti dušični oksid

Koncentracija F_ENO (Tablica 8) bila je u djece s astmom u rasponu od 2,3 – 148,0 ppb u djece s GERB-om od 2,0 – 84,0 ppb, te u kontrolnoj skupini od 2,0 – 21,9 ppb. Samo je u djece kontrolne skupine postojala normalna raspodjela vrijednosti, dok je u djece s astmom i GERB-om postojala asimetrična raspodjela.

Tablica 8. Apsolutne vrijednosti F_ENO među ispitanicima.

		Astma	GERB	Kontrola
F _E NO	Raspon	2,3 – 148,0	2,0 – 84,0	3,0 – 21,9
(ppb)	$\bar{x} \pm SD$	-	-	9,6 \pm 5,3
	Medijan	23	10	-
	IQR	9,6 – 42,1	7,2 – 12,0	-

\bar{x} = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; IQR = interkvartilni raspon;

Statistički značajna razlika za vrijednosti F_ENO postojala je u usporedbi skupina djece s astmom i djece kontrole skupine a (p = 0,0002), te u usporedbi skupine djece s astmom i djece s GERB-om (p < 0,0001). U usporedbi skupine djece s GERB-om i

kontrolne skupine vrijednosti $F_{E}NO$ nisu se statistički značajno razlikovale ($p = 0,2815$).

ROC analiza za vrijednosti $F_{E}NO$ (Tablica 9), usporedbe ispitanika s astmom i kontrolne skupine pokazala je dobru razlikovnu djelotvornost ($AUC = 0,771$; $p = 0,0001$). Izračunata granična vrijednost od 18,9 ppb imala je veću dijagnostičku specifičnost (96%) nego osjetljivosti (58%), te veću pozitivnu, PPV (97%) od negativne predvidljive vrijednosti, NPV (49%). Nedovoljno dobra razlikovna djelotvornost postojala je pri usporedbi ispitanika s GERB-om i ispitanika kontrolne skupine. Dobra razlikovna djelotvornost postojala je pri usporedbi ispitanika s astmom i ispitanika s GERB-om ($AUC = 0,748$; $p = 0,0001$) za graničnu vrijednost $F_{E}NO \geq 20$ ppb, pri čemu je dijagnostička osjetljivost (98%) bila je veća od specifičnosti (55%), a PPV (70%), manja od NPV (97%).

Tablica 9. ROC analiza za vrijednosti $F_{E}NO$ među ispitivanim skupinama.

$F_{E}NO$ (ppb)	Astma/kontrola (N -59/30)	GERB/kontrola (N -75/30)	Astma/GERB (N - 59/75)
AUC	0,771	0,579	0,748
SE	0,055	0,0705	0,0476
Granična vrijednost	>18,9	> 6,9	≥ 20
Osjetljivost	58%	80%	98%
Specifičnost	96%	50%	56%
PPV	97%	80%	70%
NPV	49%	50%	97%
p	0,0001	0,2632	0,0001

AUC – površina ispod krivulje; SE – standardna pogreška; PPV – pozitivna predvidljiva vrijednost; NPV – negativna predvidljiva vrijednost

4. 4. Kondenzat izdaha

Količina dobivenoga kondenzata izdaha nije se statistički (ANOVA test $p = 0,225$) razlikovala među skupinama ispitanika: u djece s astmom uzorkovano je $2,1 \pm 0,7$ mL

(raspon 1,0 – 3,5 mL), djece s GERB-om $2,1 \pm 0,8$ mL (raspon 0,3 – 4,0 mL), te u djece kontrolne skupine $1,8 \pm 0,5$ mL (raspon 1,2 – 2,8 mL) kondenzata.

4. 4. 1. pH, parcijalni tlak kisika i ugljik dioksida kondenzata izdaha

Vrijednosti pH, pO_2 i pCO_2 prikazani su u Tablici 10, a rezultati parametrijske i neparametrijske statističke analize u Tablici 11. Djeca s astmom imala su statistički značajno manje vrijednosti pH u kondenzatu izdaha ($6,84 \pm 0,40$) nego djeca s GERB-om ($6,99 \pm 0,35$, $p = 0,0293$), odnosno djeca kontrolne skupine ($7,05 \pm 0,35$, $p = 0,0207$). Istodobno nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima pH između djece s GERB-om i djece kontrolne skupine (Tablice 10 i 11).

Pri usporedbi rezultata (Tablice 10 i 11) uočeno je da su djeca s astmom imala statistički značajno veće vrijednosti pO_2 u kondenzatu izdaha ($18,83 \pm 4,07$ kPa) nego djeca kontrolne skupine ($16,73 \pm 3,58$ kPa, $p = 0,0232$), odnosno djeca s GERB-om ($16,41 \pm 5,87$ kPa, $p = 0,0146$). Ujedno su vrijednosti pCO_2 bile statistički značajno manje u djece s GERB-om u odnosu na djecu kontrolne skupine ($p = 0,0053$), dok među ostalim skupinama nije bilo statistički značajne razlike (Tablice 10 i 11).

Tablica 10. Vrijednosti pH, pO_2 i pCO_2 u kondenzatu izdaha ispitanika s astmom, GERB-om i kontrolne skupine

		Astma	GERB	Kontrola
pH	Raspon	5,95 – 7,80	6,19 – 7,61	6,38 – 7,87
	$\bar{x} \pm SD$	$6,84 \pm 0,40$	$6,99 \pm 0,35$	$7,05 \pm 0,35$
pO_2	Raspon	11,18 – 26,7	4,30 – 27,31	10,85 – 22,99
	$\bar{x} \pm SD$	$18,83 \pm 4,07$	$16,41 \pm 5,87$	$16,73 \pm 3,58$
pCO_2	Raspon	0,35 – 4,42	0,20 – 5,47	0,60 – 4,44
	$\bar{x} \pm SD$	$2,07 \pm 1,2$	-	$1,51 \pm 1,14$
	Medijan	-	1,25	-
	IQR	-	0,58 – 2,09	-

\bar{x} = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; IQR = interkvartilni raspon;

Tablica 11. Statistička značajnost (p) razlike u vrijednostima pH, pO_2 i pCO_2 u kondenzatu izdaha ispitivanih skupina

p	pH	pO_2	pCO_2
Astma : Kontrola	0,0207	0,0232	0,5686
GERB : Kontrola	0,4357	0,7810	0,0053
Astma : GERB	0,0293	0,0146	0,0536

Djeca sa srednje teškom bronhoopstrukcijom ($pH = 6,92 \pm 0,42$) mala su statistički značajno manji pH nego djeca s blagom bronhoopstrukcijom ($pH = 6,71 \pm 0,34$), $p = 0,049$.

Analiza ROC-krivulje za vrijednosti pH (Tablica 12), usporedbe ispitanika s astmom i kontrolne skupine pokazala je dovoljno dobru razlikovnu djelotvornost ($AUC = 0,659$; $p = 0,0148$) za graničnu vrijednost od $\leq 6,98$. Dijagnostička osjetljivost iznosila je 68%, a specifičnost 70%. Vrijednost PPV (78%) bila je veća od vrijednosti NPV (58%). Što se tiče usporedbe ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine, ROC analiza je pokazala nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost. U usporedbi ispitanika s astmom i djece s GERB-om razlikovna djelotvornost bila je dovoljno dobra ($AUC = 0,622$; $p = 0,0168$) za graničnu vrijednost $< 6,991$. Dijagnostička osjetljivost (55%) bila je manja od dijagnostičke specifičnosti (70%), a PPV (75%), veća od NPV (50%).

Tablica 12. Vrijednosti ROC analize za pH, pO_2 i pCO_2 u kondenzatu izdaha. Prikazana je usporedba rezultata u djece ispitivanih skupina.

pH	Astma/kontrola (N -59/30)	GERB/kontrola (N -75/30)	Astma/GERB (N - 59/75)
AUC	0,659	0,535	0,622
SE	0,065	0,0632	0,0511
Granična vrijednost	$\leq 6,982$	$\leq 6,977$	$< 6,991$
Osjetljivost	68 %	45 %	55 %
Specifičnost	70 %	70 %	70 %
PPV	78 %	79%	75 %
NPV	58 %	34 %	50 %
p	0,0148	0,5807	0,0168
pO_2			
AUC	0,655	0,498	0,616
SE	0,0624	0,0627	0,0532
Granična vrijednost	18,61 kPa	$\leq 13,27$ kPa	$\leq 14,63$ kPa
Osjetljivost	55%	39 %	43 %
Specifičnost	77 %	80 %	85 %
PPV	79 %	83 %	82 %
NPV	52 %	35 %	49%
p	0,0130	0,9771	0,0289
pCO_2			
AUC	0,553	0,621	0,651
SE	0,0669	0,0626	0,0522
Granična vrijednost	$>1,61$ kPa	$\leq 0,72$ kPa	$\geq 1,69$ kPa
Osjetljivost	62 %	35%	66 %
Specifičnost	57 %	93 %	62 %
PPV	69 %	69 %	73 %
NPV	49 %	37 %	54 %
p	0,4266	0,0528	0,0039

AUC – površina ispod krivulje; SE – standardna pogreška; PPV – pozitivna predvidljiva vrijednost; NPV – negativna predvidljiva vrijednost

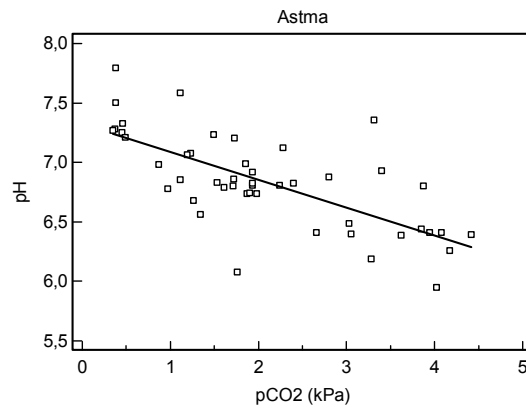
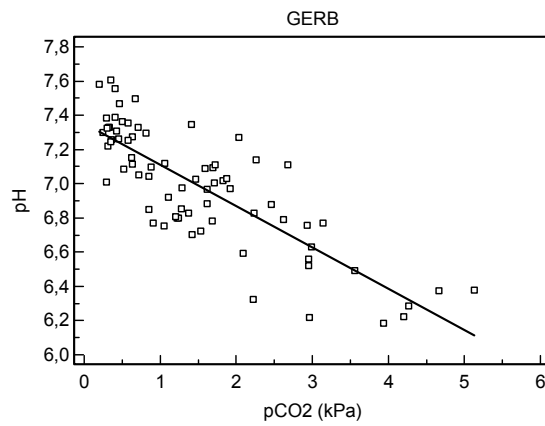
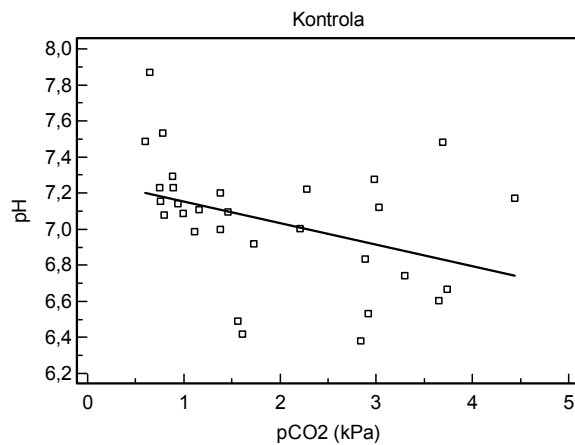
ROC analiza vrijednosti pO_2 (Tablica 12), usporedbe ispitanika s astmom i kontrolne skupine pokazala je dovoljno dobru razlikovnu djelotvornost (AUC = 0,655; p = 0,0130) za graničnu vrijednost od 18,61 kPa. Dijagnostička osjetljivost iznosila je

55%, a specifičnost 77%). Vrijednost PPV (79%) bila je veća od vrijednosti NPV (52%). Što se tiče usporedbe ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine, ROC analiza je pokazala nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost. U usporedbi ispitanika s astmom i GERB-om razlikovna djelotvornost bila je dovoljno dobra (AUC = 0,616; $p = 0,0289$) za graničnu vrijednost $\leq 14,63$ kPa. Dijagnostička osjetljivost (43%) bila je manja od dijagnostičke specifičnosti (85%), a PPV (82%), veća od NPV (49%).

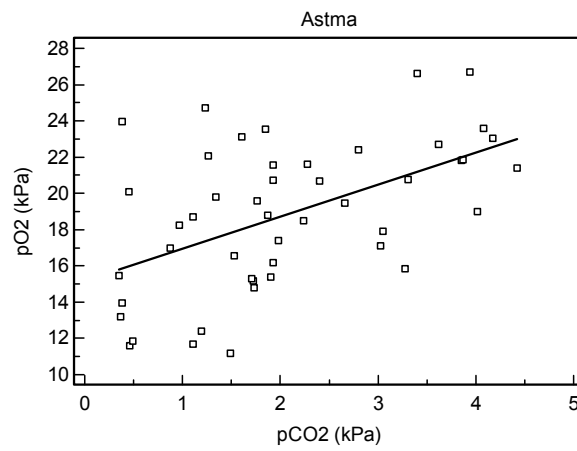
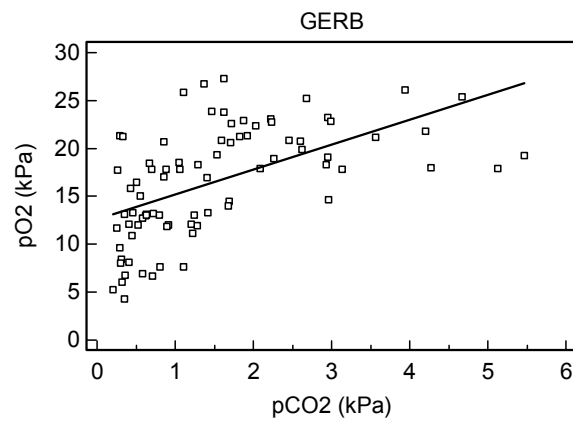
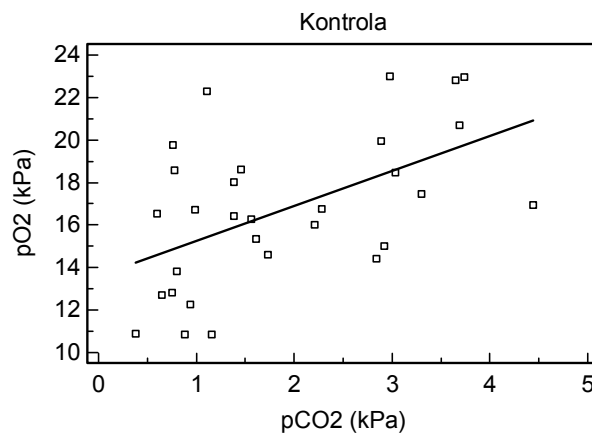
ROC analiza za vrijednosti $p\text{CO}_2$ u usporedbi ispitanika s astmom i kontrolne skupine pokazala je nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost (AUC = 0,553; $p = 0,4266$) za graničnu vrijednost $> 1,61$ kPa. U usporedbi ispitanika s astmom i ispitanika kontrolne skupine utvrdila se dovoljno dobra razlikovna djelotvornost (AUC = 0,621) ali bez statističke značajnosti, $p = 0,0528$ za graničnu vrijednost $p\text{CO}_2 \leq 0,72$ kPa. Usporedba ispitanika s astmom i GERB-om također je bila dovoljno dobra, ali bez statističke značajnosti, $p = 0,0522$ za graničnu vrijednost $p\text{CO}_2 > 1,69$ kPa.

Vrijednosti pH bile su obrnuto razmjerne s vrijednostima $p\text{CO}_2$ kako u djece s astmom, Slika 6A ($r = -0,6991$; $p < 0,0001$), tako i u djece s GERB-om, Slika 6B ($r = -0,784$; $p < 0,0001$) i u djece kontrolne skupine, Slika 6C ($r = -0,3942$; $p = 0,0311$).

Vrijednosti $p\text{O}_2$ i $p\text{CO}_2$ bile su razmjerne u svim ispitivanim skupinama: u djece s astmom, Slika 7A, ($r = 0,5207$; $p = 0,0002$), GERB-om, Slika 7B. ($r = 0,680$; $p < 0,0001$) i u djece kontrolne skupine, Slika 7C ($r = 0,5203$; $p < 0,0032$).

A**B****C**

Slika 6. Korelacija između pH i $p\text{CO}_2$ u djece s astmom (A) ($r = -0,6991$; $p < 0,0001$), GERB-om (B) ($r = -0,784$; $p < 0,0001$) i djece kontrolne skupine (C) ($r = -0,3942$; $p = 0,0311$).

A**B****C**

Slika 7. Korelacija između $p\text{O}_2$ i $p\text{CO}_2$ u djece s astmom (A) ($r = 0,5207$; $p = 0,0002$), GERB-om (B) ($r = 0,680$; $p < 0,0001$) i djece kontrolne skupine (C) ($r = 0,5203$; $p = 0,0032$).

4. 4. 2. Koncentracije željeza, kalcija i magnezija

Djeca s astmom i GERB-om imala su statistički značajno manju koncentraciju željeza (Tablice 13 i 14) nego djeca kontrolne skupine (astma : kontrola: $p < 0.0001$; GERB : kontrola: $p = 0,0017$). Koncentracija kalcija nije se statistički značajno razlikovala u djece s astmom i djece s GERB-om u odnosu na djecu kontrolne skupine, ali je postojala značajna razlika u koncentraciji kalcija između djece s astmom i djece s GERB-om ($p = 0,0222$). Djeca s astmom odnosno GERB-om imala su statistički značajno manju koncentraciju magnezija u odnosu na kontrolnu skupinu djece (astma : kontrola: $p = 0,0026$; GERB : kontrola: $p = 0,0027$), ali se vrijednosti magnezija nisu značajno razlikovale u skupinama djece s astmom i djece s GERB-om. Omjer magnezija i kalcija bio je najveći u djece s astmom, manji u djece s GERB-om a najmanji u djece kontrolne skupine (astma > GERB > kontrola). Razlike su među skupinama bile statistički značajne (Tablica 14).

Tablica 13. Vrijednosti željeza, kalcija, magnezija i omjera magnezij:kalcij u kondenzatu izdaha ispitanika s astmom, GERB-om i kontrolne skupine

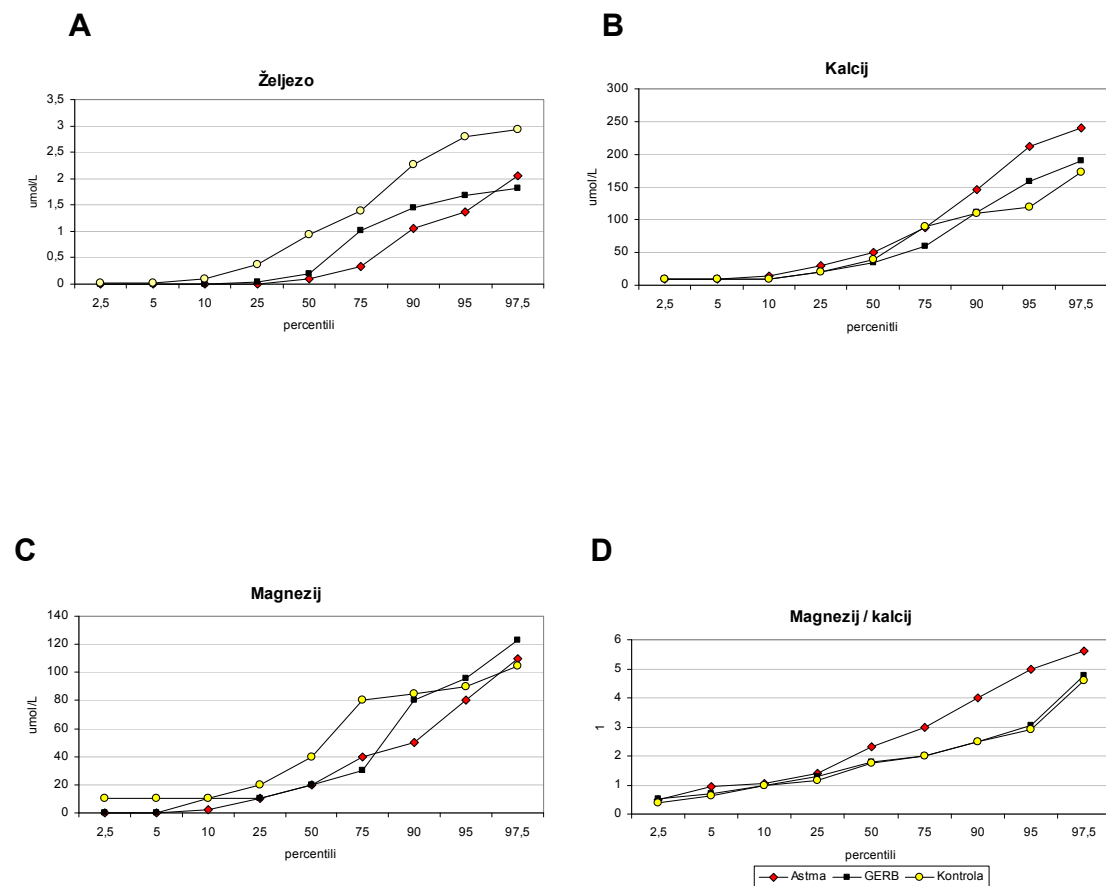
		Astma	GERB	Kontrola
Željezo ($\mu\text{mol/L}$)	Raspon	0 – 2,8	0 – 2,21	0,01 – 2,99
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-	-	1,03 \pm 0,81
	Medijan	0,1	0,2	-
	IQR	0,1 – 0,33	0,04 – 1,01	-
Kalcij ($\mu\text{mol/L}$)	Raspon	0 – 280	10 – 250	10 – 190
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-	-	-
	Medijan	50	35	40
	IQR	30 – 88	20 – 60	20 – 90
Magnezij ($\mu\text{mol/L}$)	Raspon	0 – 110	0 – 150	10 – 110
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-	-	48 \pm 30
	Medijan	20	20	-
	IQR	10 – 40	10 – 30	-
Magnezij:kalcij	Raspon	0,5 – 7,0	0,3 – 6,0	0,1 – 3,5
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	-	-	1,4 \pm 0,9
	Medijan	2,3	1,8	-
	IQR	1,4 – 3,0	1,3 – 2,0	-

\bar{x} = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; IQR = interkvartilni raspon;

Tablica 14. Statistička značajnost razlike u koncentraciji željeza, kalcija, magnezija i omjera magnezij:kalcij u kondenzatu izdaha između ispitivanih skupina

p	Željezo	Kalcij	Magnezij	Magnezij/kalcij
Astma : Kontrola	< 0,0001	0,3332	0,0026	0,0001
GERB : Kontrola	0,0017	0,5278	0,0027	0,0240
Astma : GERB	0,0239	0,0222	0,9778	0,0044

Iz percentilnih vrijednosti (Slika 8) vidljivo je da je koncentracija željeza (Slika 8A) u kondenzatu izdaha u većeg broja djece s astmom i djece s GERB-om bila manja nego u kontrolnoj skupini. U malog broja djece s astmom vrijednosti kalcija (Slika 8B) bile su veće nego u djece s GERB-om, odnosno u kontrolnoj skupini, a vrijednosti magnezija (Slika 8C) u većeg broja djece s GERB-om i astmom bile su manje nego u djece kontrolne skupine. Omjer magnezij/kalcij (Slika 8D) je u većeg broja djece s astmom bio veći nego u djece s GERB-om odnosno djece kontrolne skupine.



Slika 8. Percentilne vrijednosti željeza (A), kalcija (B), magnezija (C) i omjera magnezij/kalcij (D) u djece s astmom, GERB-om i kontrolne skupine

4. 4. 3. Analiza ROC-krivulje

Rezultati ROC-analize prikazani su u Tablici 15. Najbolja dijagnostička točnost (diskriminacijska učinkovitost) granične vrijednosti koncentracije željeza postojala je pri usporedbi vrijednosti u skupini astmatičara prema kontrolnoj skupini (AUV = 0,805; vrlo dobra razlikovna učinkovitost). Granična vrijednost koncentracije željeza za koju je postojala najbolja osjetljivost i specifičnost bila je $\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$ (astma prema kontroli). Slabija je dijagnostička točnost postojala za usporedbu GERB prema kontroli ($\leq 0,6 \mu\text{mol/L}$; AUC = 0,697) odnosno astma prema GERB-u ($0,1 \mu\text{mol/L}$; AUC = 0,615). Osjetljivost od 84% podrazumijeva da 84% pacijenata s astmom ima

koncentraciju željeza $\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$, a 16% pacijenata $> 0,5 \mu\text{mol/L}$. Među zdravima 70% ispitanika ima koncentraciju željeza $> 0,5 \mu\text{mol/L}$, a 30% njih ima koncentraciju željeza manju od te granične vrijednosti. PPV (84%) bila je veća od NPV (70%). Što se tiče usporedbe ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine, ROC analiza je pokazala dovoljno dobru razlikovnu djelotvornost za graničnu vrijednost $\leq 0,6 \mu\text{mol/L}$, uz dijagnostičku osjetljivost od 67%) i dijagnostičku specifičnost od 70%). U usporedbi ispitanika s astmom i GERB-om razlikovna djelotvornost bila je dovoljno dobra (AUC = 0,615; $p = 0,0183$) za graničnu vrijednost koncentracije željeza $> 0,1 \mu\text{mol/L}$, te dijagnostička osjetljivost od 65%, a dijagnostičku specifičnost do 58%. Vrijednost PPV (67%) bila je veća od NPV (56%).

Tablica 15 . Vrijednosti analize ROC-krivulje za koncentraciju željeza u kondenzatu izdaha. Prikazana je usporedba rezultata u djece ispitivanih skupina.

Željezo	Astma/kontrola (N -59/30)	GERB/kontrola (N -75/30)	Astma/GERB (N – 59/75)
AUC	0,805	0,697	0,615
SE	0,0531	0,0598	$< 0,0487$
Granična vrijednost	$\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$	$\leq 0,6 \mu\text{mol/L}$	$> 0,1 \mu\text{mol/L}$
Osjetljivost	84%	67%	65%
Specifičnost	70%	70%	58%
PPV	84%	85%	67%
NPV	70%	46%	56%
p	0,0001	0,0010	0,0183

Analiza ROC-krivulje za vrijednosti kalcija (Tablica 16), usporedbe ispitanika s astmom i kontrolne skupine pokazala je nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost (AUC = 0,563; $p = 0,3218$) za graničnu vrijednost od $> 20 \mu\text{mol/L}$. Dijagnostička osjetljivost iznosila je 78%, a specifičnost 37%). Vrijednost PPV (71%) bila je veća od vrijednosti NPV (46%). Što se tiče usporedbe ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine, ROC analiza je pokazala nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost (AUC = 0,540; $p = 0,5307$) za graničnu vrijednost $\leq 70 \mu\text{mol/L}$. U usporedbi ispitanika s astmom i GERB-om razlikovna djelotvornost također je bila nedovoljno dobra (AUC =

0,616; $p = 0,0191$) za graničnu vrijednost $\leq 30 \mu\text{mol/L}$. Dijagnostička osjetljivost (50%) bila je manja od dijagnostičke specifičnosti (71%), a PPV (69%), veća od NPV (53%).

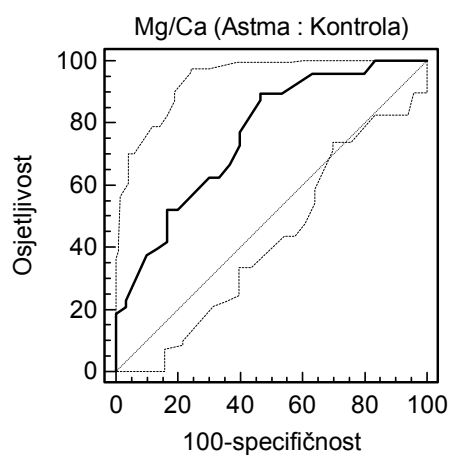
ROC-analiza za vrijednosti magnezija (Tablica 16), pri usporedbi ispitanika s astmom i ispitanika kontrolne skupine pokazala je nedovoljno dobru razlikovnu djelotvornost ($\text{AUC} = 0,697$; $p = 0,0014$) za graničnu vrijednost od $> 20 \mu\text{mol/L}$. Dijagnostička osjetljivost iznosila je 78%, a specifičnost 37%). Vrijednost PPV (71%) bila je veća od vrijednosti NPV (46%). Što se tiče usporedbe ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine, ROC analiza je pokazala dovoljno dobru razlikovnu djelotvornost ($\text{AUC} = 0,688$; $p = 0,0018$) za graničnu vrijednost $\leq 70 \mu\text{mol/L}$. U usporedbi ispitanika s astmom i GERB-om razlikovna djelotvornost također je bila nedovoljno dobra ($\text{AUC} = 0,616$; $p = 0,0191$) za graničnu vrijednost $\leq 30 \mu\text{mol/L}$. Dijagnostička osjetljivost (50%) bila je manja od dijagnostičke specifičnosti (71%), a PPV (69%), veća od NPV (53%).

Analiza ROC-krivulje omjera magnezij/kalcij (Tablica 16), u usporedbi rezultata dobivenih kod ispitanika s astmom i ispitanika kontrolne skupine pokazala je dobru razlikovnu djelotvornost ($\text{AUC} = 0,760$; $p = 0,0001$) za graničnu vrijednost od $> 1,1$. Dijagnostička osjetljivost iznosila je 90%, specifičnost 53%, a vrijednosti PPV iznosila je 75% odnosno NPV - 76%. Usporedba ispitanika s GERB-om i kontrolne skupine pokazala je dovoljno dobru razlikovnu djelotvornost ($\text{AUC} = 0,643$; $p = 0,0134$) za graničnu vrijednost $> 1,3$. Pripadajuće vrijednosti dijagnostičke osjetljivosti (74%) bile su veće od vrijednosti specifičnosti (60%), a vrijednosti PPV (81%) bile su veće od vrijednosti NPV (50%). U usporedbi ispitanika s astmom i GERB-om razlikovna djelotvornost također je bila dovoljno dobra ($\text{AUC} = 0,655$; $p = 0,0030$) za graničnu vrijednost omjera magnezij/kalcij $\geq 2,1$. Dijagnostička osjetljivost (84%) bila je značajno veća od dijagnostičke specifičnosti (52%). Pritom su vrijednosti PPV odnosno NPV bile podjednake (PPV = 72%; NPV = 69%).

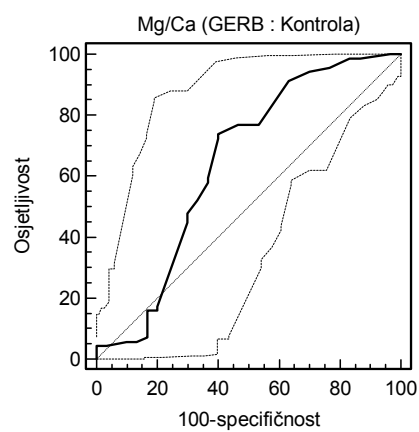
Tablica 16. Vrijednosti ROC analize za koncentraciju kalcija i magnezija te omjer magnezij/kalcij u kondenzatu izdaha. Prikazana je usporedba rezultata u djece ispitivanih skupina.

Kalcij	Astma/kontrola (N -59/30)	GERB/kontrola (N -75/30)	Astma/GERB (N – 59/75)
AUC	0,563	0,540	0,616
SE	0,0636	0,0632	0,0493
Granična vrijednost	> 20 $\mu\text{mol/L}$	$\leq 70 \mu\text{mol/L}$	$\leq 30 \mu\text{mol/L}$
Osjetljivost	78 %	84 %	50 %
Specifičnost	37 %	30 %	71 %
PPV	71 %	75 %	69 %
NPV	46 %	43 %	53 %
p	0,3218	0,5307	0,0191
Magnezij			
AUC	0,697	0,688	0,499
SE	0,0616	0,0603	0,0511
Granična vrijednost	$\leq 50 \mu\text{mol/L}$	$\leq 20 \mu\text{mol/L}$	> 50 $\mu\text{mol/L}$
Osjetljivost	91 %	60 %	16 %
Specifičnost	43 %	70%	91 %
PPV	75 %	83 %	71 %
NPV	72 %	41 %	46 %
p	0,0014	0,0018	0,9778
Magnezij/kalcij			
AUC	0,760	0,643	0,655
SE	0,0536	0,0579	0,0522
Granična vrijednost	> 1,1	> 1,3	$\geq 2,1$
Osjetljivost	90 %	74 %	84 %
Specifičnost	53 %	60 %	52 %
PPV	75 %	81 %	72 %
NPV	76 %	50 %	69 %
p	0,0001	0,0134	0,0030

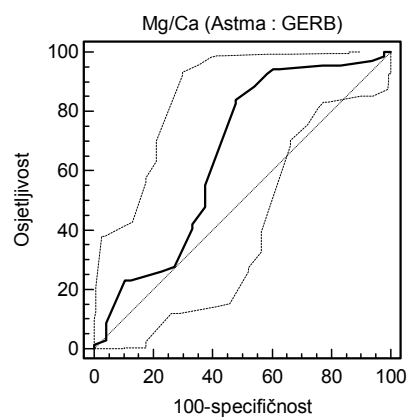
A



B



C



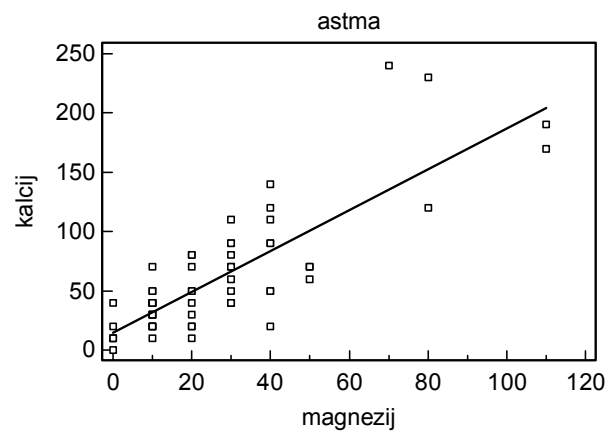
Slika 12. ROC krivulje za omjer magnezija i kalcija u kondenzatu izdaha; A - usporedba astma : kontrolna skupina: za graničnu vrijednost $> 1,1$ osjetljivost je 90%

a 100 – specifičnost je 47%; B - usporedba GERB : kontrolna skupina: za graničnu vrijednost $> 1,3$ osjetljivost je 60% a 100 – specifičnost je 19% i C – usporedba astma : GERB: za graničnu vrijednosti $> 0,1 \mu\text{mol/L}$, osjetljivost je 84% a 100 – specifičnost je 48%;

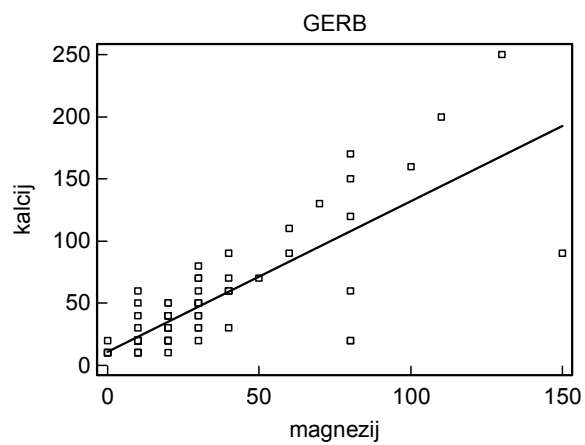
4. 5. Korelacija

Između magnezija i kalcija postojala je značajna pozitivna korelacija (Slika 10) u bolesnika: najbolja je korelacija postojala u bolesnika s GERB-om ($r = 0,782$; $p < 0,0001$, Slika 10B), odnosno u djece s astmom ($r = 0,754$; $p < 0,0001$, Slika 10A), a najslabija u djece kontrolne skupine ($r=0,469$; $p=0,012$, Slika 10C).

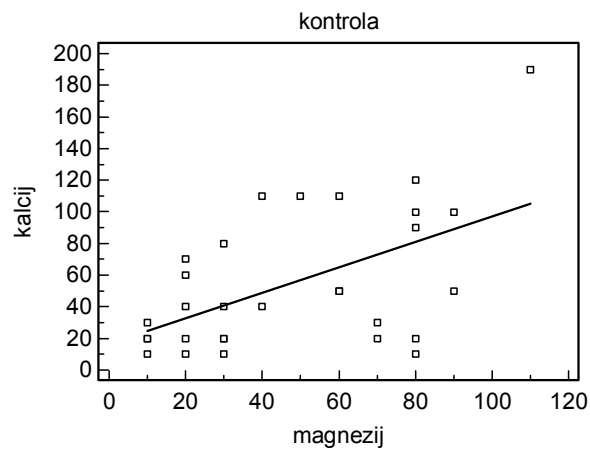
A



B



C



Slika 13. Korelacija između kalcija i magnezija u djece s astmom (A) ($r = 0,754$; $p < 0,0001$), GERB-om (B) ($r = 0,782$; $p < 0,0001$) i djece kontrolne skupine (C) ($r = 0,469$; $p = 0,012$).

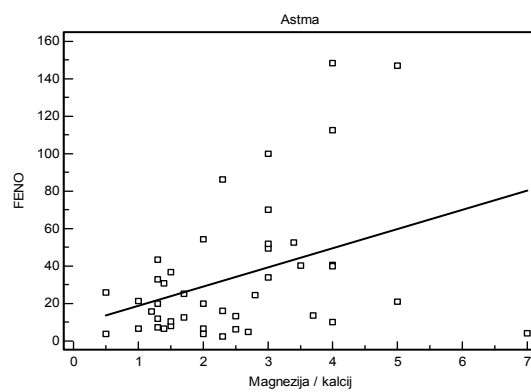
Negativna korelacija postojala je između vrijednosti željeza, kalcija odnosno magnezija s vrijednostima pH u djece s GERB-om, ali ne i u djece s astmom i djece kontrolne skupine (Tablica 17). Iz podataka korelaciji proizlazi da su koncentracija kalcija ($r = -0,332$, $p = 0,024$) i osobito magnezija ($r = -0,411$, $p = 0,006$) bile veće u uzorcima s manjim pH.

Tablica 17. Korelacija između vrijednosti željeza, kalcija i magnezija s vrijednostima pH među ispitivanim skupinama djece.

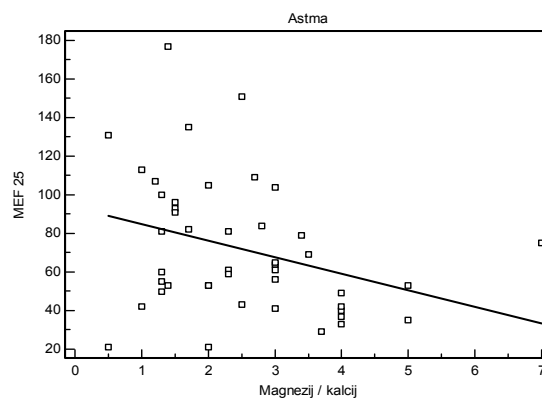
		Astma	GERB	Kontrola
Željezo : pH	r	- 0,263	- 0,232	- 0,033
	p	0,082	0,048	0,864
Kalcij : pH	r	- 0,332	- 0,194	- 0,015
	p	0,024	0,100	0,135
Magnezij : pH	r	- 0,411	- 0,280	- 0,035
	p	0,006	0,017	0,852

U bolesnika s astmom postojala je značajna pozitivna korelacija između omjera magnezij/kalcij i F_{ENO} ($r = 0,385$; $p = 0,010$, Slika 11A), a negativna korelacija između omjera magnezij/kalcij i vrijednosti MEF_{25} , ($r = -0,359$; $p = 0,014$, Slika 11B) te između omjera magnezij/kalcij i vrijednosti MEF_{50} , ($r = -0,393$; $p = 0,007$, Slika 11C).

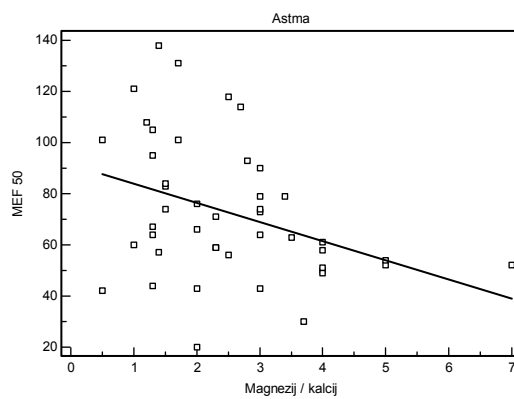
A



B



C



Slika 11. Korelacija između omjera magnezij/kalcij i vrijednosti $F_{E}NO$ (A) ($r = 0,385$; $p = 0,010$), odnosno omjera magnezij/kalcij i vrijednosti MEF_{25} (B) ($r = -0,329$; $p =$

0,028) te omjera magnezij/kalcij i vrijednosti MEF_{50} (C) ($r = -0,373$; $p = 0,012$) u djece s astmom.

5. RASPRAVA

Ovo je istraživanje pokazalo da je u kondenzatu izdaha moguće odrediti parametre acidobazne ravnoteže (pH , pO_2 i pCO_2), te koncentraciju željeza, kalcija i magnezija, kako u djece s astmom i djece s GERB-om tako i u klinički zdrave djece. Smanjene vrijednosti pH u bolesnika s astmom u usporedbi s kontrolnom skupinom nesumnjivo su pokazale postojanje kiselog stresa u tekućini koja oblaže njihove dišne putove, što kod bolesnika s GERB-om nije bio slučaj. Narušena homeostaza željeza u plućima, dokazana je i u bolesnika s astmom i u bolesnika s GERB-om što, imajući u vidu ulogu željeza u plućima, posredno ukazuje na dinamične promjene oksidativnih i antioksidativnih procesa unutar dišnog sustava kod tih dviju skupina bolesnika. Promijenjen odnos magnezija i kalcija u kondenzatu izdaha (iona ključnih za relaksaciju mišića bronha odnosno njihovu konstrikciju) bolesnika s astmom i s GERB-om u odnosu na kontrolnu skupinu posljedica je redistribucije tih iona između stanica mišića bronha i tekućine koja ih oblaže.

Određivanje pH u tjelesnim tekućinama svakodnevna je, i vrlo korisna pretraga u kliničko-laboratorijskoj dijagnostici. Na popis tjelesnih tekućina u kojima je moguće određivati vrijednosti pH stavljen je i kondenzat izdaha, što je omogućilo neinvazivno praćenje promjena kiselosti tekućine koja oblaže dišne putove. U ovom su istraživanju srednje vrijednosti pH u bolesnika s astmom ($6,84 \pm 0,40$), bolesnika s GERB-om ($6,99 \pm 0,35$), ali i u većine djece kontrolne skupine ($7,05 \pm 0,35$) bile u kiselom području. Međutim kiselost kondenzata izdaha bila je izraženija u djece s astmom nego u djece s GERB-om ($p = 0,0293$), odnosno u djece kontrolne skupine ($p = 0,0207$).

Rezultati u djece s astmom u skladu su s brojnim istraživanjima koja su pokazala da je acidifikacija u dišnom sustavu popratna pojava različitih plućnih bolesti, primjerice akutnog oštećenja pluća, astme, KOPB, cistične fibroze, bronhiektazija (146, 147, 148, 149). Ipak ima i istraživanja kod kojih se razlika u vrijednostima pH između astmatičara i kontrolne skupine ispitanika nije dokazala (131). U odraslih bolesnika s blagom astmom dokazano je postojanje kiselog stresa u nekoliko istraživanja (125,146,150). Ojoo i sur. te Brunetti i sur. su u djece s blagom, klinički stabilnom

astmom (srednja vrijednost pH = 5,82) dobili vrijednosti pH u kiselom području (151), odnosno u djece s akutnom astmom u kiselijem području nego u djece sa stabilnom astmom (130). I naši su rezultati pokazali da je u djece s težom bronhoopstrukcijom kiselost kondenzata izdaha bila veća ($\text{pH} = 6,27 \pm 0,40$) nego u djece s blažom bronhoopstrukcijom ($\text{pH} = 6,98 \pm 0,34$). Apsolutne vrijednosti pH u različitim istraživanjima ne mogu se uspoređivati, zbog neujednačenih predanalitičkih postupaka (I), koji još uvijek nisu standardizirani. Moguća je usporedba samo onih rezultata koji se dobiju jednakim postupcima. Naše je iskustvo također pokazalo da je, u cilju dobivanja reproducibilnih rezultata, potrebno da uzorkovanje i prepremu kondenzata izdaha provodi uvijek ista osoba.

Zbog veće kiselosti tekućine koja oblaže dišne putove u osoba s astmom Effros i sur. počeli su koristiti izraz acidopneja ("acid breath" - "acidopnoea") (127, 192), što je potaknulo raspravu o ispravnosti upotrebe toga izraza: može li se uopće za dah govoriti da je kiseo? Widdicombe smatra da riječ "acidopneja" nije moguće koristiti u znanstvenom izričaju, jer dah, koji je plin, ne može biti ni kiseo ni alkalni (153). Ricciardolo i sur. su 2004. godine počeli u bolesnika s astmom koristiti pojam «kiselostres» (*acid stress*), a pH kao indikator kiselostresa (154). Kiselostres podrazumijeva izraženo (ekscesivno) i nekontrolirano zakiseljavanje tekućine koja oblaže dišne putove uzrokovano poremećajem homeostatskih regulacijskih mehanizama. Bez obzira na terminologiju, ostaje činjenica da se vrijednost pH u kondenzatu izdaha djece s astmom nalazi u kiselijem području nego u zdrave djece, te da je pH pomaknut u kiselije područje ako se radi o akutnom astmatskom napadaju. Pojačana kiselost može nastati kao rezultat endogenih patoloških procesa (astma) a može biti uzrokovana i vanjskim činiteljima (akcidentalna inhalacija kiseline, inhalacija štetnih čestica, GER). Kod bolesnika s astmom narušava se homeostaza pH u dišnim putovima, a kod kiselostresa uzrokovanog vanjskim činiteljima do zakiseljavanja dolazi iznenada. Neovisno o tome radi li se o endogenom ili egzogenom uzroku acidifikacije tekućine koja oblaže dišne putove, posljedice će biti jednake – pojaviti će se mikrovaskularna eksudacija, pojačano stvaranje sluzi, dušičnog oksida, hiperreaktivnosti dišnih putova, bronhokonstrikcije, kašlja (154). Neka istraživanja *in vivo* i *in vitro*, kako animalna tako i humana, povezala su pojavu bronhokonstrikcije,

povećanje viskoznosti sluzi (155), smanjenu pokretljivost cilija (156), razvoj upale, te u konačnici oštećenje epitela, upravo s procesom zakiseljavanja tekućine koja oblaže dišne putove. Budući da je izmjerena vrijednost pH tjelesnih tekućina odraz trenutnih zbivanja (150), stupanj kiselosti kondenzata izdaha mogao bi biti odraz intenziteta akutne upale u bolesnika s astmom. Prema Kostikas i sur. (146) u bolesnika s umjerenom astmom je postojala korelacija između vrijednosti pH, broja eozinofilnih granulocita u iskašljaju i koncentracije nitrata odnosno nitrita, te smatraju da vrijednosti koreliraju s oksidacijskim stresom. U konačnici bi to značilo da su kiseli stres i oksidacijski stres uzročno-posljedično povezani. Hunt (125) i Vaughan i sur. (1147) smatraju da je određivanje pH u standardiziranom uzorku kondenzata izdaha reproducibilno i da može biti korisno kako u dijagnozi tako i u praćenju medikamentozne terapije u upalnim bolestima dišnog sustava.

U literaturi je manje podataka o vrijednostima pH u kondenzatu izdaha bolesnika s GERB-om nego u bolesnika s astmom. Prema Hunt J i sur. osobe s GERB-om mogu imati manji pH u kondenzatu izdaha ako se uzorak kondenzata uzorkuje vrlo kratko nakon faringealnog refluksa – unutar 15-ak minuta (157). Ta činjenica ukazuje da je u bolesnika s GERB-om važno vrijeme uzorkovanja kondenzata izdaha. Shimizu i sur. su pokazali da je pH u kondenzatu izdaha (uzorak pripreman bez nadslojavanja s argonom) manji u bolesnika s astmom koji su ujedno imali i GERB ($\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$), nego u astmatičara bez GERB-a ($7,3 \pm 0,6$) (158, 159). U bolesnika s udruženim bolestima radi se i o istodobnom djelovanju različitih patomehanizmima, što su potvrdili Carpagnano i sur. koji su pokazali da su bolesnici s udruženim GERB-om i astmom imali, osim povećanog broja eozinofilnih granulocita u induciranom iskašljaju, i povećan broj neutrofilnih granulocita u iskašljaju te povećanu koncentraciju IL-6 u kondenzatu izdaha (160).

Podataka o vrijednostima pH u kondenzatu izdaha u djece s GERB-om u dostupnoj literaturi nismo našli. Povećana kiselost kondenzata izdaha u našem istraživanju postojala je u neke djece s GERB-om, dok je u većine djece bila jednaka vrijednostima u kontrolnoj skupini. Prema Hunt i sur. (157) dva su mehanizma nastanka simptoma GERB-a: prema prvome mehanizmu, kiseli sadržaj se podiže do laringealne odnosno hipofaringealne regije, a prema drugome mehanizmu radi se o

ezofagealnom refluksu. Oba mehanizma izazivaju kašalj jer utječu na vagalni refleks, ali prvi mehanizam ima i izraženije simptome refluksa jer dovodi do zakiseljavanja dišnih putova, što kod drugog mehanizma nije slučaj. U tom bi se kontekstu možda mogle tumačiti vrijednosti pH u našoj skupini djece s GERB-om. Možda bi se smanjena pH vrijednost u neke od te djece mogla pripisati kraćem vremenu proteklom od refluksne epizode do uzorkovanja kondenzata izdaha, ali takvo tumačenje ne proizlazi iz vlastitih rezultata, nego zaključaka drugih autora (157).

U svrhu procjene dijagnostičke važnosti određivanja pH u odabranim skupinama djece učinjena je analiza ROC-krivulje, koja je pokazala najbolju dijagnostičku vrijednost (ali još uvijek samo dovoljno dobru, $AUC = 0,659$) pri usporedbi vrijednosti pH u djece s astmom i djece kontrolne skupine. Granična vrijednost pH koja razlikuje djecu s akutnom egzacerbacijom astme od djece kontrolne skupine iznosila je 6,98. 70% djece kontrolne skupine imalo je vrijednosti pH veće, a 68% djece s akutnom egzacerbacijom astme imalo je vrijednost pH manju od te granične vrijednosti. Temeljem PPV-a od 78% može se pretpostaviti da se u djeteta s akutnom egzacerbacijom astme, koje ima $pH \leq 6,98$, s vjerojatnošću od 78% ti simptomi uistinu mogu pripisati akutnom astmatskom napadaju. Dijagnostička djelotvornost usporedbe granične vrijednosti pH između djece s GERB-om i djece kontrolne skupine nije bila statistički značajna ($p = 0,5801$). Analiza ROC-krivulje pH pri usporedbi djece s astmom i djece s GERB-om je pokazala da 55% bolesnika s akutnom egzacerbacijom astme imalo $pH < 6,99$, a 70% djece s GERB-om vrijednost $pH > 6,99$. PPV u djece s akutnom egzacerbacijom astme prema djeci s GERB-om od 75% znači da dijete s vrijednosti $pH < 6,99$ sa 75% vjerojatnosti ima akutnu egzacerbaciju astme, a NPV od 50% da dijete sa simptomima GERB-a i vrijednošću $pH > 6,99$ s vjerojatnošću od 50% ima GERB.

Dijagnostička djelotvornost određivanja pH u kondenzatu izdaha vjerojatno se može poboljšati standardiziranom pripremom kondenzata za analizu. Budući da vrijednost pH ovisi o utjecaju ambijentalnih uvjeta, prvenstveno o parcijalnom tlaku ugljičnog dioksida (II), neophodno je uzorak kondenzata izdaha nakon uzorkovanja standardizirati u smislu ujednačavanja upravo pCO_2 . Standardizacijom se uklanja CO_2 iz uzorka te tako smanjuje njegov utjecaj CO_2 na određivanje pH. To se može postići

propuhivanjem s inernim plinom argonom ili nekim drugim inernim plinom. Prema smjernicama Američkoga torakalnog društva (161) pH u kondenzatu izdaha se može određivati prije propuhivanja s argonom (postiže se izbacivanje CO_2 iz kondenzata izdaha) ili nakon propuhivanja, budući da bez standardizacije vrijednost pH nije stabilna jer se mijenja pod utjecajem atmosfere i izdahnutog CO_2 . U kontaktu s ambijentalnim zrakom parcijalni tlak CO_2 se postupno smanjuje - dio se otapa u vodi i stvara ugljičnu kiselinu, koja smanjuje pH. pH se stoga brzo mijenja (II). U našem istraživanju kontakt s ambijentalnim zrakom izbjegnut je nadslojavanjem kondenzata izdaha argonom. Nadslojavanje može, prema našim rezultatima do analize (unutar 5 minuta), odgoditi otpuštanje CO_2 odnosno povećanje pH vrijednosti. Stoga je parcijalni tlak plinova i pH potrebno odrediti u što kraćem vremenu od uzorkovanja. Nejasno je kako su Bloemen i sur. su u uzorku koji nije bio obrađen s argonom (niti propuhivanjem niti nadslojavanjem) unutar 5 minuta od uzorkovanja dobili vrijednosti pH u izrazito kiselom području (medijan 6,17) (162). U literaturi su opisani različiti načini standardizacije, i još uvijek nema ujednačenog stava. Mi se zalažemo za nadslojavanje uzorka inernim plinom argonom (I), kako bi se, zbog velikoga gradijenta $p\text{CO}_2$ između uzorka i zraka spriječio brzi izlazak CO_2 u okoliš, u kojem je $p\text{CO}_2$ vrlo mali, gotovo jednak nuli. Međutim opisani su različiti pristupi pripremi dobivenog kondenzata izdaha za analizu pH: neki su istraživači određivali pH odmah nakon uzorkovanja, odnosno bez standardizacije (148, 151) dok veći dio istraživača preporučuje standardizaciju (130, 131, 147). Kullman i sur. predlažu čak standardizaciju s CO_2 pri parcijalnom tlaku CO_2 od 5.33 kPa, što predstavlja fiziološku vrijednost $p\text{CO}_2$ (163). Borrill i sur. (164) su uspoređivali promjenu pH EBC-a u bolesnika s astmom i KOPB prije i poslije standardizacije s argonom, te pokazali da se nakon argonizacije vrijednost pH povećala za otprilike 1 pH jedinicu. Poučeni iskustvom određivanja plinova u krvi, koja ne smije doći u kontakt s ambijentalnim zrakom, zalažemo se za nadslojavanje uzorka inernim plinom argonom odmah po uzorkovanju (I), kako bi se, zbog velikoga gradijenta $p\text{CO}_2$ između uzorka i zraka spriječio brzi izlazak CO_2 u okoliš, te tako utjecao na povećanje pH uzorka. Djeca s astmom imala statistički značajno veće vrijednosti $p\text{O}_2$ nego djeca kontrolne skupine ($p = 0,0232$), odnosno djeca s GERB-om ($p = 0,0146$), a da se vrijednosti $p\text{O}_2$

između djece s GERB-om i kontrolne skupine nisu razlikovale. Zbog toga su i granične vrijednosti određene ROC-krivuljom bile različite pri usporedbi ispitivanih skupina djece. U svim je usporedbama dijagnostička specifičnost određivanja pO_2 bila veća od dijagnostičke osjetljivosti, što znači da se temeljem vrijednosti pO_2 bolje mogu definirati djeca kontrolne skupine nego bolesnici. Najbolja dijagnostička djelotvornost postojala je pri usporedbi djece s astmom i kontrolne skupine (AUC = 0,655).

Ujedno su vrijednosti pCO_2 bile statistički značajno različite između djece s GERB-om u odnosu na djecu kontrolne skupine ($p = 0,0053$), dok među ostalim skupinama nije bilo statistički značajne razlike. Općenito se vrijednosti pCO_2 mogu smatrati konfuznima, čemu u prilog ide i analiza ROC-krivulja pri usporedbi različitih skupina ispitanika. Dijagnostička efikasnost vrijednosti pCO_2 u razlikovanju djece s astmom od djece kontrolne skupine te djece s GERB-om od djece kontrolne skupine nije bila statistički značajna. U literaturi nema podataka o rezultatima analize ovih plinova u kondenzatu izdaha, pa je dobivene rezultate teško tumačiti. Iz opće fiziologije poznato je da se svakim udahom u mirovanju 10% zraka u plućima zamijeni s atmosferskim zrakom (165), u kojem je $pO_2 = 21$ kPa, a $pCO_2 = 0$. pO_2 u udahu iznosi oko 20 kPa, a u alveolama oko 14,7 kPa, dok pCO_2 u alveolama iznosi oko 5,3 kPa (165, 166). Rozycki i sur. su u novorođenčadi liječenih u intenzivnoj njezi (dob <8 dana; porođajna tjelesna masa <1000 g) dobili vrijednosti pCO_2 $5,24 \pm 1,57$ kPa (167).

Vrijednosti pO_2 i pCO_2 bile su izravno razmjerne u svim ispitivanim skupinama. Rezultati pCO_2 i pO_2 mogli bi ukazati da dobiveni uzorak kondenzata izdaha predstavlja mješavinu izdahnutih i udahnutih plinova, što je i očekivano, budući da se kondenzat izdaha uzorkuje tijekom mirnog disanja kada je volumen disanja mali, a mrtvi prostor relativno veliki (168). Zbog toga dolazi do miješanja udahnutog zraka iz mrtvog prostora i izdahnutog zraka iz alveola i bronha. Moglo bi se pretpostaviti da su vrijednosti pO_2 bile veće u djece s astmom zbog toga što je u egzacerbaciji bolesti ekspirij otežan i produljen pa se analizira zrak koji je tijekom izdisaja zaostao u velikim dišnim putovima (traheja). Dio zraka iz alveola se smanjuje, a dio iz mrtvog prostora je konstantan. Zbog toga se mijenja omjer kisika i ugljičnog dioksida, te posljedično promjeni pCO_2 i pH vrijednost. Prema tome, plići udah, te manji i sporiji izdah u djece s egzacerbacijom astme rezultirali su povećanim parcijalnim tlakom kisika u

kondenzatu izdaha u usporedbi s kontrolnom skupinom djece (**V**). Prema tome, činjenici da je u bolesnika s astmom otežan izdisaj, moguće je pripisati razliku u parcijalnom tlaku plinova u djece s astmom i djece kontrolne skupine. Te je rezultate potrebno potvrditi ispitivanjem na većem broju bolesnika.

Vrijednosti pH bile su obrnuto razmjerne s vrijednostima $p\text{CO}_2$ kako u djece s astmom, tako i u djece s GERB-om i u djece kontrolne skupine, što ukazuje da otopljeni ugljični dioksid, pri čemu nastaje ugljična kiselina, ima značajan utjecaj na vrijednost pH u kondenzatu izdaha.

Za fiziologiju i patofiziologiju respiratornog trakta od velike je važnosti održavanje homeostaze željeza (137, 139). Željezo je esencijalno za život pa stoga njegova raspoloživost mora biti pod odgovarajućom kontrolom. U suprotnom, poremećaji regulacije metabolizma željeza, posebice uz smanjenu antioksidativnu zaštitu mogu biti povezani s bolestima raznih organa, pa tako i pluća (138). Lokalni deficit, ali i akumulacija željeza, koji se mogu pratiti određivanjem koncentracije transferina odnosno i određivanjem ekspresije transferinskog receptora (169) mogu rezultirati promjenom pojedinih funkcija respiratornog trakta. Željezo u slobodnom obliku, može katalizirati stvaranje agresivnih reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva te ovisno o njihovim koncentracijama uzrokovati oštećenje biomolekula ili utjecati na mehanizme redoks signalizacije u organizmu (170).

U ovom su istraživanju i djeca s astmom ($p < 0,0001$) i djeca s GERB-om ($p = 0,0017$) imala statistički značajno manju koncentraciju željeza nego djeca kontrolne skupine, a smanjenje koncentracije željeza bilo je izraženije u djece s astmom nego u djece s GERB-om. Dodatno je analiza ROC-krivulje pokazala da je određivanje koncentracije željeza u kondenzatu izdaha djece s astmom imalo vrlo dobru dijagnostičku valjanost ($\text{AUC} = 0,805$) pri usporedbi s vrijednostima željeza u djece kontrolne skupine, odnosno dovoljno dobru ($\text{AUC} = 0,697$) pri usporedbi djece s GERB-om i djece kontrolne skupine. Određivanje željeza u djece s astmom imalo je bolju dijagnostičku osjetljivost nego specifičnost odnosno bolji PPV od NPV. Dijagnostička osjetljivost od 84% znači da je 84% djece s astmom imalo vrijednosti željeza u kondenzatu izdaha \leq

0,5 $\mu\text{mol/L}$, ako se uspoređuju s vrijednostima u kontrolnoj skupini. Specifičnost od 70% podrazumijeva da je 70% djece kontrolne skupine imalo vrijednosti željeza veće od 0,5 $\mu\text{mol/L}$. Iz dobivenih se rezultata također može s 84% vjerojatnosti (PPV) predvidjeti da će se u djeteta sa simptomima akutne egzacerbacije astme i koncentracijom željeza u kondenzatu izdaha $\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$ moći s 84% vjerojatnosti smatrati da ima akutnu egzacerbaciju astme. Dijagnostička djelotvornost određivanja željeza u kondenzatu izdaha djece sa simptomima GERB-a je nešto slabija, ali ima veliku PPV, koja također znači da se s 85% vjerojatnosti može predvidjeti da se simptomi GERB-a i u djeteta s koncentracijom željeza u kondenzatu izdaha $\leq 0,6 \mu\text{mol/L}$ mogu pripisati GERB-u.

Promijenjena homeostaza željeza u plućima u bolesnika s astmom i u bolesnika s GERB-om potvrđuje da određivanje željeza u kondenzatu ima smisla jer dobiveni rezultati ukazuju na dinamične promjene oksidativnih i antioksidativnih procesa unutar dišnog sustava kod tih dviju skupina bolesnika.

U dostupnoj literaturi objavljena su samo dva ispitivanja o prisutnosti željeza u kondenzatu izdaha. Mutti i sur. ustanovili su snižene vrijednosti željeza u EBC bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike (171), i pripisali je depleciji željeza, zbog kronične upale. a Griesse i sur. su u EBC ispitanika sa cističnom fibrozom odredili željezo, u vrlo niskim koncentracijama samo sporadično (172). U prethodnom smo ispitivanju (IV) osim koncentracije željeza određivali i koncentraciju feritina te ukupnu katalitičku aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u kondenzatu izdaha. Uz smanjenu koncentraciju željeza u djece s astmom postojala povećana koncentracija feritina te povećana katalitička aktivnost SOD u odnosu na djecu kontrolne skupine. Iz dinamike promjena koncentracije željeza i feritina moglo bi se pretpostaviti da se koncentracija željeza smanjuje, jer se pojačava intracelularna sinteza feritina, odnosno da dolazi do preraspodjele (sekvestracije) željeza u skladišni, neštetni oblik. Prema Stitesu (173) moguće je da se stvara feritin s više teških podjedinica (H) koji veže željezo puno brže i u metabolički dostupnijem obliku. U aktivaciju gena za sintezu H podjedinica feritina, osim povećane koncentracije željeza mogu biti uključeni i sami reaktivni kisikovi spojevi (174) i TNF-alfa čija je koncentracija najčešće povećana u

upalnim bolestima pluća (175). Čini se da SOD može sudjelovati u modulaciji ekspresije transferinskih receptora kao i proteina koji regulira željezo (176).

Sadržaj željeza i proteina, neophodnih za odgovarajući metabolizam željeza (npr. feritin, transferin, dvovalentni metalni transporter, laktoferin i dr.), ispituje se najvećim dijelom u plućnim makrofagima te BAL ili sputumu (136, 177,178). Temeljem tih ispitivanja ustanovljeno je da se većina željeza nalazi intracelularno u alveolarnim makrofagima, a samo petina u tekućini koja oblaže epitel dišnog sustava (177). Željezo se u BAL-u nalazi u obliku transferina, laktoferina i feritina, a tzv. „slobodno“ željezo vezano je za specifičan protein albumin ili za spojeve male molekularne težine (137). Pluća predstavljaju jedinstveno tkivo za oksidacijski stres zato što je izravno izloženo većem utjecaju oksidansa. Zbog toga je lokalni pO_2 na strani alveola znatno veći nego u ostalim vitalnim organima kao što su mozak, srce odnosno jetra. Budući da su pluća svojom velikom površinom (oko 70 m²) konstantno izložena utjecaju ambijentalnog zraka, stanice pluća „trpe“ svakodnevni oksidacijski stres uzrokovan štetnim tvarima iz okoliša koje generiraju slobodne radikale (primjerice cigaretni dim, ozon, kancerogene tvari). Infekcija, odnosno upala i aktivacija upalnih stanica s posljedičnim nakupljanjem slobodnih radikala tipični su patomehanizmi većine plućnih bolesti. Poremećen metabolizam željeza opisan je u sputumu bolesnika s kroničnim bronhitisom i cističnom fibrozom (178) i u BALu bolesnika s različitim plućnim bolestima (137), npr. bolesnika sa stabilnom cističnom fibrozom (173), bolesnika s akutnim respiratornim distress-sindromom, ARDS (139), kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti, KOPB te kod pušača (171). Većina tih radova ukazuje da povećana koncentracija ekstracelularnog željeza može katalizirati oksidativne procese koji djeluju destruktivno na tkivo u donjem dijelu dišnog sustava (137,139, 173, 178).

Transportni proteini koji sudjeluju u metabolizmu željeza, kao što su transferin i laktoferin te skladišni protein feritin, zbog svoga djelovanja imaju prooksidativne (otpuštanje željeza, posebice iz feritina) i antioksidativne (vezanje željeza u oblik koji ne može katalizirati reakcije nastanka slobodnih radikala) značajke. Ovi proteini nađeni su u tekućini koja oblaže dišne puteve (179), u BAL (173), alveolarnim makrofagima (136) te u kondenzatu izdaha (IV). Transferin u BAL dospijeva transudacijom iz plazme ali i lokalnom sintezom (137), a laktoferin potječe uglavnom iz

dišnih putova a manje iz alveola (137). Feritin, čini se, ima dvojaku ulogu u BALu: može poslužiti ili kao «hvatač» željeza (antioksidativni učinak) ili kao izvor željeza. Većina biomarkera pristutnih u BAL-u ili induciranom sputumu može se određivati i u kondenzatu izdaha, naravno uz nužnu standardizaciju. Ipak treba biti svjestan činjenice da je u kondenzatu izdaha, zbog velikog razrjeđenja tekućine koja oblaže alveole, mala koncentracija svih biomarkera, ali i činjenice da je dugotrajna stabilnost tih biomarkera upitna. Vlastito je iskustvo pokazalo da je koncentraciju feritina i katalitičku aktivnost SOD potrebno odrediti u svježem uzorku, što u svakodnevnom radu predstavlja gotovo nepremostivu prepreku.

Toksičnost reaktivnih kisikovih spojeva ovisi o kiselosti sredine. U eksperimentalnom zakiseljavanju tekućine koja oblaže alveole štakora zapaženo je pojačano lokalno stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (180). U našem istraživanju slaba negativna korelacija između pH i koncentracije željeza bila je statistički značjana samo u djece s GERB-om, a u djece s astmom bila je tek naznačena, ali bez statističke značajnosti. Čini se da se u sredini sa smanjenim pH povećava sinteza feritina kako bi se spriječilo oštećenje zbog postojećeg oksidacijskog stresa.

Ioni kalcija i magnezija ključni su konstrikciju odnosno relaksaciju mišića bronha. Rezultati istraživanja dokazuju mogućnost određivanja mikromolarnih koncentracija kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha, kao i veće ili manje promjene njihovih koncentracija kod djece s astmom i GERB, u odnosu na kontrolnu skupinu. Osobito je omjer između magnezija i kalcija s većom statističkom značajnošću ukazao na promjene u određenoj patologiji nego apsolutne vrijednosti pojedinačnih analita. Iz tog se omjera vidi da je u kondenzatu izdaha djece s astmom i s GERB-om veća koncentracija kalcija nego magnezija, za razliku od zdravih ispitanika kod kojih je u kondenzatu izdaha veća koncentracija magnezija. Omjer magnezija i kalcija bio je najveći u djece s astmom, manji u djece s GERB-om a najmanji u djece kontrolne skupine (astma > GERB > kontrola). Ovo je istraživanje potvrdilo naše preliminarne rezultate na manjem broju ispitanika (III).

Bronhokonstrikcija je, uz upalu, temeljna karakteristika astme, pri čemu kalcij (Ca^{2+}) djeluje kao važan aktivator kontrakcija u glatkim mišićima dišnih putova, a sudjeluje i u remodeliranju dišnih putova (12). Magnezij je, kao fiziološki antagonist kalcija, važan

za relaksaciju glatkih mišića, a manjak magnezija povezan je s povećanom kontraktilnošću glatkog mišićja, pa tako i bronhalnih glatkih mišića (181). Tijesna korelacija između magnezija i kalcija u kondenzatu izdaha bolesnika s astmom i GERD-om pokazuje da u tim stanjima stvarno postoji njihova tijesna inter-reaktivnost. Koncentracija magnezija u serumu predstavlja tek mali dio ukupnog magnezija u organizmu – oko 1% ukupnog magnezija. Osim toga serumske vrijednosti ne odražavaju intracelularnu koncentraciju magnezija. Iako je postojala ideja da bi se serumski magnezij mogao pokazati korisnim biljekom u praćenju akutnih astmatskih napadaja, određivanje magnezija u serumu nije se u tom smislu pokazalo dijagnostički korisnim (181), vjerojatno stoga što postoji stalna redistribucija magnezija između različitih stanica. Međutim još uvijek nema konačnog stajališta o tome koja vrsta stanica najbolje odražava status magnezija u organizmu (69). Promijenjen omjer kalcija i magnezija u polimorfonuklearnim leukocitima bolesnika s KOPB-om i u pušača (182) u odnosu na zdrave ispitanike također ukazuje na redistribuciju magnezija. Prema nekim istraživanjima čini se da je da povećanje koncentracije ioniziranog kalcija rezultira povećanjem koncentracije ioniziranog magnezija (183). Koeficijent korelacije između magnezija i kalcija u našem istraživanju pokazuje dobru korelaciju u djece s astmom ($r = 0,754$; $p < 0,0001$) i vrlo dobru korelaciju u djece s GERB-om ($r = 0,782$; $p < 0,0001$), za razliku od neznatne povezanosti u djece kontrolne skupine ($r = 0,469$; $p = 0,012$). Ti podatci o korelaciji dodatno potvrđuju da se u bolesnika s astmom i GERB-om uistinu radi o redistribuciji tih iona između staničnog i izvanstaničnog odjeljka.

Mirčetić i sur. određivali su magnezij u plazmi, leukocitima i mokraći u tijeku akutnog astmatskog napada te pet dana nakon primjene salbutamola (relaksant glatkih mišića) te ukazali na dinamičnu redistribuciju magnezija tijekom tih pet dana (184). Početna smanjena koncentracija magnezija u leukocitima i mokraći normalizirala se nakon terapije, a koncentracija magnezija u plazmi bila je sve vrijeme povećana. Hashimoto i sur. nisu dobili smanjene vrijednosti magnezija u leukocitima nego u eritrocitima, pa zaključuju da postoje smanjene zalihe magnezija odabranih pacijenata (185). Autori također smatraju da je nespecifična bronhalna reaktivnost obrnuto razmjerna koncentraciji magnezija u eritrocitima.

U dostupnoj literaturi nismo našli podataka o koncentraciji magnezija i kalcija u kondenzatu izdaha ni u bolesnika s astmom ni u bolesnika s GERB-om. Effros i suradnici određivali su koncentraciju magnezija i kalcija u liofiliziranim uzorcima kondenzata izdaha bolesnika s KOPB (8), te pokazali da nema razlike u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Naše je istraživanje, uz već objavljene rezultate (III), ali na manjem broju ispitanika prvi pokušaj ispitivanja tih mikroelemenata u nativnom kondenzatu izdaha. Prvi rezultati dobiveni na manjem broju ispitanika ukazali su da bi omjer magnezija i kalcija mogao biti bolji pokazatelj nego apsolutne vrijednosti magnezija i kalcija. Ispitivanja na većem broju ispitanika dodatno su potvrdila početna razmišljanja – omjer magnezij/kalcij je statistički značajno ($p = 0,0001$) veći u djece s astmom nego u djece kontrolne skupine, s dijagnostičkom osjetljivošću od 90% ($AUC = 0,760$) za graničnu vrijednost omjera od 1,1. Dijagnostička osjetljivost za omjer magnezija i kalcija je veća od dijagnostičke specifičnosti (53%), što znači da se temeljem toga indeksa bolje mogu definirati djeca s astmom.

Postojanje negativne korelacije između analiziranih iona i vrijednosti pH u ispitivanim skupinama potvrđuje njihovu uzajamnu povezanost. Djeca s GERB-om koja su imala manje vrijednosti pH u kondenzatu izdaha imala su veću koncentraciju željeza. U djece s astmom trend negativne korelacije željeza i pH samo je naznačen, ali nije imao statističku značajnost. Budući da takva korelacija nije postojala u kontrolnoj skupini, dobiveni rezultati ukazuju na povezanost oksidacijskog stresa s kiselim stresom u djece koja su imala smanjene vrijednosti pH u kondenzatu izdaha. Negativna korelacija kalcija i osobito magnezija s vrijednostima pH bila je značajna u djece s astmom. U djece s GERB-om postojala je samo negativna korelacija pH s koncentracijom magnezija. Korelacija u kontrolnoj skupini nije postojala, pa se može pretpostaviti da se radi o različitoj redistribuciji kalcija i osobito magnezija u tekućini koja oblaže alveole s kiselim stresom u ispitivanim skupinama.

Kiseli i oksidacijski stres mogu utjecati na stupanj upale u dišnim putovima (154). Imajući u vidu da vrijednost pH odražava trenutnu kiselost tekućine koja oblaže dišne putove (1150), te da je redistribucija magnezija i kalcija također posljedica brzih dinamičnih aktualnih procesa (184) određivanje tih biomarkera moglo bi pomoći u procjeni akutne upale u dišnim putovima. Vrijednosti željeza u kondenzatu izdaha

odražavaju kroničnu upalu kod bolesnika s plućnim bolestima (174), pa bi smanjena koncentracija željeza u prikazanih bolesnika mogla odražavati kronične promjene. Činjenica da je upala dišnih putova u astmatičara povezana s oksidacijskim stresom uzrokovanim povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (150) dodatno ukazuje da bi vrijednosti željeza (kao odraz održavanja oksidacijske-antioksidacijske ravnoteže) u kondenzatu izdaha mogle biti pokazatelj kroničnih promjena. Tome u prilog idu već opisane povećane vrijednosti feritina i SOD u djece s astmom (IV). Slijedom tih rezultata mogao bi se procijeniti mehanizam koji u djece s GERB-om uzrokuje simptome slične simptomima astme, odnosno procijeniti kod koje djece postoji ezofagealni refluks, a kod koje je uzrok prodor kiselog želučanog sadržaja do laringealne odnosno hipofaringealne regije (157).

Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da se u kondenzatu izdaha mogu pouzdano određivati pH, koncentracija željeza, kalcija i magnezija. Iako se radi o uobičajenim biomarkerima moguće je dobiti vrijedne podatke u svrhu ispitivanja patomehanizama kiselog i oksidacijskog stresa te mehanizama bronhokonstrikcije. Pokazalo se da u patofiziologiji astme i GERB-a važnu ulogu imaju upala (kiselostres), narušena homeostaza željeza (oksidacijski stres), te redistribucija kalcija i magnezija (bronhokonstrikcija). Odabrani biomarkeri iz kondenzata izdaha mogu upotpuniti rezultate određivanja F_{ENO} i mjerenja plućne funkcije u djece s astmom. U djece sa simptomima GER-a mogu, zajedno s 24-satnom pH-metrijom jednjaka, pomoći u probiru djece s laringealnim/hipofaringealnim refluksom od djece s ezofagealnim refluksom. Dobiveni rezultati mogu biti temelj za daljnja, osobito longitudinalna istraživanja, te tako utjecati i na mogućnost individualizacije terapije u području pedijatrijske pulmologije u kojoj nedostaju odgovarajući uzorci za neinvazivnu dijagnostiku.

6. ZAKLJUČCI

1. Srednje vrijednosti pH u kondenzatu izdaha bolesnika u akutnoj egzacerbaciji astme ($6,84 \pm 0,40$), djece s GERB-om ($6,99 \pm 0,35$) te u većine djece kontrolne skupine ($7,05 \pm 0,35$) su u kiselom području. Djeca u akutnoj egzacerbaciji astme imaju međutim, značajno manje vrijednosti pH nego djeca s GERB-om ($p = 0,0293$), i djeca kontrolne skupine ($p = 0,0207$). Razlike u vrijednostima pH između djece s astmom i GERB-om nisu značajne (Tablice 10 i 11).
2. Koncentracija željeza je značajno manja u djece u akutnoj egzacerbaciji astme ($M [IQR] = 0,1 [0,1 - 0,33] \mu\text{mol/L}$; $p < 0,0001$) i djece s GERB-om ($M [IQR] = 0,2 [0,04 - 1,01] \mu\text{mol/L}$; $p = 0,0017$) nego u djece kontrolne skupine ($1,03 \pm 0,81 \mu\text{mol/L}$). Smanjenje koncentracije je izraženije u djece s akutnom egzacerbacijom astme nego u djece s GERB-om ($p = 0,0239$) (Tablice 13 i 14).
3. Koncentracija kalcija ne razlikuje se značajno u djece u akutnoj egzacerbaciji astme ($M [IQR] = 50 [30 - 88] \mu\text{mol/L}$) i GERB-om ($M [IQR] = 35 [20 - 60] \mu\text{mol/L}$) u odnosu na djecu kontrolne skupine ($M [IQR] = 40 [20 - 90] \mu\text{mol/L}$). Djeca s GERB-om imaju značajno manju koncentraciju kalcija nego djeca u akutnoj egzacerbaciji astme ($p = 0,0222$) (Tablice 13 i 14).
4. Koncentracija magnezija je značajno manja u djece u akutnoj egzacerbaciji astme ($M [IQR] = 20 [10 - 40] \mu\text{mol/L}$; $p = 0,0026$) i GERB-om ($M [IQR] = 20 [10 - 30] \mu\text{mol/L}$; $p = 0,0027$) u odnosu na kontrolnu skupinu djece ($48 \pm 30 \mu\text{mol/L}$). Vrijednosti magnezija ne razlikuju se značajno u skupinama djece u akutnoj egzacerbaciji astme i GERB-om (Tablice 13 i 14).
5. Omjer magnezij/kalcij je najveći u djece u akutnoj egzacerbaciji astme ($M [IQR] = 2,3 [1,4 - 3,0]$), manji u djece s GERB-om ($M [IQR] = 1,8 [1,3 - 2,0]$), a najmanji u djece kontrolne skupine ($1,4 \pm 0,9$). Te su razlike među skupinama značajne (astma : kontrola - $p = 0,0001$; GERB : kontrola - $p = 0,0240$; astma : GERB - $p = 0,0044$) (Tablice 13 i 14).
6. U bolesnika u akutnoj egzacerbaciji astme utvrđena je neznatna pozitivna povezanost između omjera magnezij/kalcij i F_{ENO} ($r = 0,385$; $p = 0,010$), te

nezatna negativna povezanost između omjera magnezij/kalcij i vrijednosti MEF_{25} , ($r = -0,329$; $p = 0,028$) MEF_{50} , ($r = -0,373$; $p = 0,012$) (Slika 11A).

7. Dijagnostička osjetljivost određivanja pH (granična vrijednosti $\leq 6,982$) kod djece u akutnoj egzacerbaciji astme iznosi 68%, a specifičnost 70% ($p = 0,0148$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 12).
8. Dijagnostička osjetljivost određivanja koncentracije željeza (granična vrijednosti $\leq 0,5 \mu\text{mol/L}$) kod djece u akutnoj egzacerbaciji astme iznosi 84%, a specifičnost 70% ($p = 0,0001$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 15).
9. Dijagnostička osjetljivost određivanja koncentracije željeza (granična vrijednost $\leq 0,6 \mu\text{mol/L}$) u djece s GERB-om iznosi 67%, a specifičnost 70% ($p = 0,0010$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 15).
10. Dijagnostička učinkovitost/ili djelotvornost određivanja koncentracije željeza u izdahnutom kondenzatu je bolja za postavljanje dijagnoze akutne egzacerbacije astme. (proizlazi iz zaključaka 8 i 9).
11. Dijagnostička osjetljivost određivanja omjera magnezij/kalcij (granična vrijednosti $>1,1$) u djece u akutnoj egzacerbaciji astme iznosi 90%, a specifičnost 53% ($p = 0,0001$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 16).
12. Dijagnostička osjetljivost određivanja omjera magnezij/kalcij (granična vrijednosti $> 1,3$) u djece s GERB-om iznosi 74%, a specifičnost 60% ($p = 0,0134$) u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 16).
13. Dijagnostička osjetljivost određivanja omjera magnezij/kalcij (granična vrijednosti $\geq 2,1$) u djece u akutnoj egzacerbaciji astme iznosi 84%, a specifičnost 52% ($p = 0,0030$) u odnosu na djecu s GERB-om (Tablica 16).

7. SAŽETAK

Cilj: Odrediti komparativne vrijednosti pH, željeza, kalcija i magnezija u kondenzatu izdaha djece s astmom, djece s GERB-om i djece kontrolne skupine.

Ispitanici: Ispitanici, djeca i adolescenti u dobi od 5 – 16 godina, svrstani su u tri skupine: I. djeca s umjerenom trajnom astmom, u akutnoj egzacerbaciji (N = 59), II. djeca s GERB-om (N = 75), III. kontrolna skupina djece (N = 30).

Metode: Kondenzat izdaha prikupljen je standardnom metodom pomoću aparata EcoScreen (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany). Uzorak je nadslojen s argonom (protok argona od 6 Lmin⁻¹ kroz 2 minute). Odmah su određeni pH, pO_2 i pCO_2 na analizatoru Ecosys II (EschweilerGmbH&Co. KG, Kiel, Germany). Uzorak je potom do analize pohranjen na -80°C. Nakon odmrzavanja određene su koncentracije željeza, magnezija i kalcija, na automatskom selektivnom analizatoru Olympus AU 400 (Olympus, Tokyo, Japan).

Rezultati: Smanjene vrijednosti pH u kondenzatu izdaha bolesnika s astmom u usporedbi s kontrolnom skupinom nesumnjivo su pokazale postojanje kiselog stresa u tekućini koja oblaže dišne putove, što kod bolesnika s GERB-om nije bio slučaj. Poremećaj homeostaze željeza u plućima, dokazan je i u bolesnika u akutnoj egzacerbaciji astme i u bolesnika s GERB-om, što ukazuje na dinamične promjene oksidativnih i antioksidativnih procesa unutar dišnog sustava kod tih dviju skupina bolesnika. Promijenjen odnos magnezija i kalcija u bolesnika u akutnoj egzacerbaciji astme odnosno s GERB-om u odnosu na kontrolnu skupinu ukazuje na redistribuciju tih iona između stanica mišića bronha i tekućine koja ih oblaže.

Zaključak: Utvrđena je dijagnostička vrijednost određivanja pH u izdahnutom kondenzatu djece u akutnoj egzacerbaciji astme, te željeza i omjera magnezij /kalcij u djece u akutnoj egzacerbaciji astme i djece s GERB-om. U patofiziologiji astme i GERB-a važnu ulogu imaju upala (kiselostres), narušena homeostaza željeza (oksidacijski stres), te redistribucija kalcija i magnezija (bronhokonstrikcija). Promijenjene vrijednosti tih biomarkera u kondenzatu izdaha mogu biti korisni, dodatni dijagnostički pokazatelji uz uobičajeno određivanje F_{ENO} i mjerenja plućne funkcije u djece s astmom, odnosno 24-satne pH-metrije jednaka u djece s GERB-om.

8. SUMMARY

Aim: to define comparative values of pH, iron, calcium and magnesium in exhaled breath condensate (EBC) of children with acute asthma exacerbation, children with gastroesophageal reflux disease (GERD) and controls.

Subjects: exhaled breath condensate (EBC) was collected with standard method by using an EcoScreen condenser (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany). Each sample was submitted to argon overlining (6 Lmin^{-1} for 2 minutes). Right afterwards the determination of pH, $p\text{O}_2$ and $p\text{CO}_2$ on the Ecosys II analyzer (Eschweiler GmbH & Co. KG, Kiel, Germany) proceeded. Then the EBC sample was stored at -80°C . After defrosting, the concentrations of iron, calcium and magnesium were determined on an automated selective Olympus AU 400 analyzer (Olympus, Tokyo, Japan).

Results: reduced values of pH in EBC of asthmatic children comparing to controls doubtlessly showed the existence of acid stress in fluid that overlies the airways, which was not the case in children with GERD. Disturbed homeostasis in lungs was proven both at patients with acute asthma exacerbation and GERD, which points out the dynamic changes between oxidative and antioxidative processes inside the respiratory system within these two groups. The altered relation between magnesium and calcium of both patients with acute asthma exacerbation and patients with GERD comparing to controls points at redistribution of these ions between the bronchii smooth muscle cells and the fluid that overlies them.

Conclusion: diagnostic value was found at determining pH in children with acute asthma exacerbation, then iron and magnesium/calcium ratio both in children with acute asthma exacerbation and GERD. Very important role in the pathophysiology of asthma and GERD plays the inflammation (acid stress), the disturbed homeostasis of iron (oxidative stress), and the redistribution of calcium and magnesium (bronchoconstriction). Chosen biomarkers from the EBC can complete the results of F_{ENO} and lung function measuring in children with asthma and the results of 24-hour pH-measurement in children with GERD.

9. LITERATURA

1. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, Bousquet J. Airway Inflammation in Mild Intermittent and in Persistent Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:403-9.
2. Spanevello, A; Migliori, GB; Sharara, A; Ballardini, L; Bridge, P; Pisati, P; Neri, M; Ind, PW. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:1138–1144.
3. American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2104–2117.)
4. Baraldi E, De Jongste JC. ERS, ATS. Measurement of exhaled nitric oxide in children 2001. *Eur Respir J* 2002;20:223–237.
5. Scheider L. et al. *Am Rev Respir Dis* 148: 778, 1993.
6. Čepelak I, Dodig S, Neinvazivni postupci u dijagnostici i praćenju upale dišnih putova: Kondenzat izdaha, *Biochemia medica*, 2005;15 (3-4):57-63.
7. Papineni RS, Rosenthal FS. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J Aerosol Med* 1997;10:105–116.
8. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216–220.
9. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danzinger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:731–737.
10. Rahman I. Reproducibility of oxidative stress biomarkers in breath condensate: are they reliable? *Eur Respir J* 2004;23:183–184.

11. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693–1722.
12. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Revision 2006, www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp, available 2006, December 29.
13. Bacharier LB, Bonner A, Carlsen K-H, et al. The European Pediatric Asthma Group. Diagnostis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy* 2008;63:5-34.
14. Kharitonov SA. Exhaled markers of inflammatory lung diseases: ready for routine monitoring? *Swiss Med Wkly* 2004; 134: 175-192.
15. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. On behalf of the ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523-548.
16. Stipić-Marković A, Pevec B, Radulović Pevec M, Čustović A. Prevalencija simpotma astme, alergijskog rinitisa i konjunktivitisa te atopijskog ekcema: ISAAC u populaciji školske djece u Zagrebu. *Acta Medica Croatica* 2003;57;281-5.
17. Illi S, von ME, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U. Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet* 2006;368:763–770.
18. Lemanske RF, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:502-519.
19. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006;7:95–100.
20. Nieminen, M. M., J. Kaprio, and M. Koskenvuo. 1991. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* 100: 70-75.
21. Gissler M, Jarvelin MR, Louhiala P, Hemminki E. Boys have more health problems in childhood than girls: follow-up of the 1987 Finnish birth cohort. *Acta Paediatr* 1999;88:310–314.

22. Osman M, Tagiyeva N, Wassall HJ, Ninan TK, Devenny AM, McNeill G et al. Changing trends in sex specific prevalence rates for childhood asthma, eczema, and hay fever. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:60–65.
23. de Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:68–74.
24. Postma, D. S., E. R. Bleeker, P. J. Amelung, K. J. Holroyd, J. Xu, C. I. M. Panhuysen, D. A. Meyers, and R. C. Levitt. 1995. Genetic susceptibility to asthma: bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N. Engl. J. Med.* 333: 894-900.
25. Marsh, D. G., J. D. Neely, D. R. Breazeale, B. Ghosh, L. R. Freidhoff, E. Ehrlich-Kautzky, C. Schou, G. Krishnaswamy, and T. H. Beaty. 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264: 1152-1156.
26. Shirakawa, T., A. Li, M. Dubowitz, J. W. Dekker, A. E. Shaw, J. A. Faux, C. Ra, W. O. C. M. Cookson, and J. M. Hopkin. 1994. Association between atopy and variants of the β 1 subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat. Gene.* 7: 125-130.
27. Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guillaud-Bataille M, Annesi- Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockhart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Thobie N, Vervloet D, Kauffmann F. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162 (5): 1812-8.
28. Kljaić-Turkalj M, Čvorišćec B, Tudorić N, Stipić-Marković A, Tuđman Z, Paleček I. Uloga okoliša u nastanku alergijskih bolesti dišnog sustava. *Medicus* 1997;6:5-12.

29. Illi S, von ME, Lau S, Nickel R, Gruber C, Niggemann B et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:925–931.
30. Taussig LM, Wright AL, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Martinez FD. Tucson Children's Respiratory Study: 1980 to present. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:661–675.
31. Bacharier LB, Phillips BR, Bloomberg GR, Zeiger RS, Paul IM, Krawiec M et al. Severe intermittent wheezing in preschool children: a distinct phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:604–610.
32. Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:176–180.
33. Thomas A E, Platts-Mills: Allergens in Samter's Immunologic diseases, 5. izd. Little, Brown and Comp. Boston, New YORK, Toronto, London, 1998., str. 1231-56.
34. Elgert KD. Immunology – Understanding the Immune System, Wiley-Liss Pub, New York 1996.
35. Chapmann MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhannaraj V, Pomes A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:409-18.
36. Furmonaviciene R, Shakib F. The molecular basis of allergenicity: comparative analysis of the three dimensional structures of diverse allergens reveals a common structural motif. *Mol Pathol* 2001; 54: 155-9.
37. Murray CS, Poletti G, Kebabze T, Morris J, Woodcock A, Johnston SL et al. Study of modifiable risk factors for asthma exacerbations: virus infection and allergen exposure increase the risk of asthma hospital admissions in children. *Thorax* 2006;61:376–382.
38. Sigurs N. Clinical perspectives on the association between respiratory syncytial virus and reactive airway disease. *Respir Res* 2002;3 (Suppl. 1): S8–S14.

39. Illi S, von ME, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390–395.
40. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* 2002;57:328– 332.
41. Xepapadaki P, Papadopoulos NG, Bossios A, Manoussakis E, Manousakas T, Saxoni-Papageorgiou P. Duration of postviral airway hyperresponsiveness in children with asthma: effect of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:299–304.
42. Gruber C, Illi S, Lau S, Nickel R, Forster J, Kamin W et al. Transient suppression of atopy in early childhood is associated with high vaccination coverage. *Pediatrics* 2003;111:e282– e288.
43. Johnson CC, Ownby DR, Alford SH, Havstad SL, Williams LK, Zoratti EM et al. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1218– 1224.
44. Braun Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347:869-77.
45. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995;332:133–138.
46. Moshhammer H, Hoek G, Luttmann- Gibson H, Neuberger MA, Antova T, Gehring U et al. Parental smoking and lung function in children: an international study. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1255–1263.
47. Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15 (Suppl. 16):4–32.

48. Hirsch T, Weiland SK, von ME, Safeca AF, Grafe H, Csaplovics E et al. Inner city air pollution and respiratory health and atopy in children. *Eur Respir J* 1999;14:669–677.
49. Gauderman WJ, Avol E, Lurmann F, Kuenzli N, Gilliland F, Peters J et al. Childhood asthma and exposure to traffic and nitrogen dioxide. *Epidemiology* 2005;16:737–743.
50. Bernard A, Carbonnelle S, Michel O, Higuët S, De BC, Buchet JP et al. Lung hyperpermeability and asthma prevalence in schoolchildren: unexpected associations with the attendance at indoor chlorinated swimming pools. *Occup Environ Med* 2003;60:385–394.
51. Villeneuve PJ, Leech J, Bourque D. Frequency of emergency room visits for childhood asthma in Ottawa, Canada: the role of weather. *Int J Biometeorol* 2005;50:48–56.
52. von Berg A, Koletzko S, Filipiak- Pittroff B, Laubereau B, Grubl A, Wichmann HE et al. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:718– 725.
53. von Berg A, Koletzko S, Grubl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP et al. The effect of hydrolyzed cow_s milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:533–540.
54. Lee TH, Anderson SD. Heterogeneity of mechanisms in exercise induced asthma. *Thorax* 1985;40:481–487.
55. Parsons JP, Mastronarde JG. Exerciseinduced bronchoconstriction in athletes. *Chest* 2005;128:3966–3974.
56. Wright RJ, Rodriguez M, Cohen S. Review of psychosocial stress and asthma: an integrated biopsychosocial approach. *Thorax* 1998;53:1066–1074.

57. Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:91–96.
58. Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy* 2002;32:796–802.
59. Lewkowich IP, Herman NS, Schleifer KW, Dance MP, Chen BL, Dienger KM et al. CD4⁺ CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 2005;202:1549–1561.
60. Platts-Mills TAE. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol* 1979;122: 2218-22.
61. Holt PG. The role of airway dendritic cell populations in regulation of T-cell responses to inhaled antigens: Atopic asthma as paradigm. *J Aerosol Med* 2004;15: 161-8.
62. El Biaze M, Boniface S, Koscher V. T cell activation from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003;58:844-53.
63. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:450-63.
64. van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC, Leman K, Hoogsteden HC, Prins JB. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:2107–2113.
65. Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:43–51.
66. Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 2001;56:25–29.

67. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1533–1540.
68. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:94–100.
69. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720– 1745.
70. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171: 722–727.
71. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:215– 225.
72. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:93–98.
73. Montgomery GL, Tepper RS. Changes in airway reactivity with age in normal infants and young children. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1372– 1376.
74. Gold MS, Kemp AS. Atopic disease in childhood. *Med J Aust* 2005;182:298– 304.
75. Killian KJ, Watson R, Otis J, St Amand TA, O’Byrne PM. Symptome perception during acute bronhoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:490-6.
76. Wood RA. Skin testing: making the most of every prick. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:347–349.
77. Spahn JD, Chipps BE. Office-based objective measures in childhood asthma. *J Pediatr* 2006;148:11–15.

78. Nair SJ, Daigle KL, DeCuir P, Lapin CD, Schramm CM. The influence of pulmonary function testing on the management of asthma in children. *J Pediatr* 2005;147:797–801.
79. Strunk RC, Szefer SJ, Philips BR, i sur. Relationship of exhaled nitric oxide to clinical and inflammatory markers of persistent asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:883-92.
80. Lemaske RF Jr, Green CG. Asthma in infancy and childhood. U Middleton E.Jr, Reed CE, Ellis EF, I sur. Izdavači: Allergy: principles and practice, izd. 5., St.Louis 1998; Mosby, str.877.
81. Saglani S, Nicholson AG, Scallan M, Balfour-Lynn I, Rosenthal M, Payne DN et al. Investigation of young children with severe recurrent wheeze: any clinical benefit? *Eur Respir J* 2006;27:29–35.
82. Gore C, Custovic A. Primary and secondary prevention of allergic airway disease. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:213–224.
83. Eggleston PA. Improving indoor environments: reducing allergen exposures. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:122– 126.
84. Vandeplass Y, Hassall E. Mechanisms of gastroesophageal reflux and gastroesophageal reflux disease. *JPGN* 2002;35:119-136.
85. Kolaček S. Gastroezofagealni refluks. U :Raić F, Votava Raić A i sur. *Pedijatrijska gastroenterologija. Medicinska biblioteka, Zagreb* 2002; 92-6.
86. Pulanić R. Gastroezofagealna refluksna bolest. U: Vucelić B i sur. *Gastroenterologija i hepatologija. Medicinska naklada Zagreb* 2002, 389-409.
87. 4. Orenstein SR. Gastroesophageal reflux. *Pediatric Rev* 1999;20:24-28.
88. Orel R, Markovic S. Bile in the esophagus: A factor in the pathogenesis of reflux esophagitis in children. *JPGN* 2003, 36:266-273.
89. Waring JP, Feiler MJ, Hunter JG, Smith CD, Gold BD. Childhood gastroesophageal reflux symptoms in adult patients. *JPGN* 2002;35:334-338.
90. Nelson SP, Chen EH, Syniar GM et al. Prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux during childhood: A pediatric practice-based

- survey. Pediatric Practice Research Group. Arch Pediatr Adolesc Med 2000;154:150-4.
91. Dhillon AS, Ewer AK. Diagnosis and management of gastro-oesophageal reflux in preterm infants in neonatal intensive care units. Acta Paediatr 2004; 93:88-93.
 92. Grant L, Cochran D. Can pH monitoring reliably detect gastroesophageal reflux in preterm infants ? Arch Dis Child 2001;85:F155-F8.
 93. Gibbons TE, Stockwell J, Kreh RP, et al. Population based epidemiologic survey of gastroesophageal reflux disease in hospitalized U.S. Children. Gastroenterology 2001;120:154.
 94. Hillemeier AC. Gastroesophageal reflux and esophagitis. In: Walker WA et al. Pediatric Gastrointestinal Disease, Mosby St.Louis 1996;461-8.
 95. Marshall REK, Anggiansah A, Owen WA, Manifold DK, Owen WJ. The extent of duodenogastric reflux in gastro-oesophageal reflux disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:5-10.
 96. Tytgat GNJ. Developments in gastroesophageal reflux in the past decade. Motility 1997;40:12-14.
 97. Hu FZ, Preston RA, Post JC et al. Mapping of a gene for severe pediatric gastroesophageal reflux to chromosome 13q14. JAMA 2000;284:325-34.
 98. Votava A, Raić F, Richter D, Goluža I, Pokrajac D, Svoren E. Povraćanje u dojenačkoj dobi. Acta Med Iug 1988; 42:107-14.
 99. Fass R, Malagon I, Schumlason M. Chest pain of esophageal origin. Curr Opin Gastroenterol 2001; 17:376-380.
 100. Peršić M, Ahel V, Šaina G, Leković A. Recidivirajuć i opstruktivni bronhitis u djece uzrokovani gastroezofagealnim refluksom. Medicina 1988;24: 21-5.
 101. Rožmanić V, Velepich M, Ahel V, Bonifačić D. Prolonged esophageal pH monitoring in the evaluation of gastroesophageal reflux in children with chronic tubotympanic disorders. JPGN 2002;34: 278-80.

102. Kolaček S, Grgurić J, Percl M. Kontinuirani 24-satni monitoring u dijagnostici gastroezofagealnog refluksa u djece. *Pediatr Croat* 1993;Suppl 1.37:28.
103. Tozzi A, Staiano A, Paparo F, Miele E, Maglio M, Di Meo M, Simeone D, Troncone R. Characterization of the inflammatory infiltrate in peptic oesophagitis. *Digest Liver Dis* 2001;33:452-458.
104. Gremse DA. GERD in the pediatric patient: Management considerations. *Medscape General Medicine* 2004;6(2).
105. Ryttilä P, Metso T, Heikkinen K, Saaraleinen P, Helenius IJ, Haahtela T. Airway inflammation in patients with symptoms suggestive of asthma but with normal lung function. *Eur Respir J* 2000;16:824-30.
106. Toom LM, Prins J, Overbeek SE, et. Al. Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1470-5.
107. Sandritter T. Gastroesophageal reflux disease in infants and children. *J Pediatr Health Care* 2003; 17(4):198-205.
108. Skadberg BT, Morild I, Markestad T. Abandoning prone sleeping: effect on the risk of sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 1998;132:340-3.
109. Gremse DA. Gastroesophageal reflux disease in children : An overview of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35: S297-S299.
110. Manes G, Domingues-Munoz JE, Leodolter A, Malferteiner P. Effect of cisapride on gastric sensitivity to distension, gastric compliance and duodeno- gastric reflexes in healthy humans. *Digest Liver Dis* 2001;33:407-413.
111. Tolia V, Ferry G, Gunasekaran T, Huang B, Keith R, Book L. Efficacy of lansoprazole in the treatment of gastroesophageal reflux disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:s308-S318.
112. Sontag S, Schnell TG, Miller TQ. Prevalence of esophagitis in asthmatics. *Gut*. 1992; 33: 872-876.

113. The American Lung Association Asthma Clinical Research Centers. Efficacy of esomeprazole for treatment of poorly controlled asthma. *N Engl J Med* 2009;360:1487-99.).
114. Fahy JV, Boushey HA, Lazarus Sc, Mauger EA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. Safety and reproducibility of sputum induction in asthmatic subjects in multicenter study. *Am Respir Crit Care Med* 2001;163:1470-5.
115. Green RH, Brighting CE, McKenna D et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts. A randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-21.
116. Sehnert S, Jiang L, Burdick J, Risby T. Breath biomarkers for detection of human liver disease:preliminary study. *Biomarkers* 2002;7:174-87.
117. Leung TF, Li CY, Lam CW et al. The relation between obesity and asthmatic airway inflammation. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;114:1241-56.
118. Corradi M, Rubenstein I, Andreoli E, et al. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1380-6.
119. Carpenter C, Price P, Christmas B. Exhaled breath isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury and ARDS. *Chest* 1998;114:1653-9.
120. Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004;125:2005-10.
121. Kharitonov SA, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 2000;7:174-87.
122. Fairchild CI, Stamfer JF. Particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J* 1987;48:948-9.
123. Kharitonov S. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002;7:1-32.

124. Rahman I, Kelly F. Biomarkers in breath condensate; a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Rad Res* 2003;37:1253-66.
125. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:28-34.
126. Sidorenko Gi, Zborovskii EI, Levina DI. Surface-active properties of exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Ter Arkh* 1980;52:65-8.
127. Effros RM, Dunning MB III, Biller J, Shaker R. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: 1073–80.
128. Sznajder Ji, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahun A, Factor P, Wood LD. Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989;96:606-12.
129. Ratnawati, Morton J, Henry RL, Thomas PS. Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Oct;41(10):929-36.
130. Brunetti L, Francavilla R, Tesse R, Strippoli A, Polimeno L, Loforese A, Miniello VL, Armenio L. Exhaled breath condensate pH measurement in children with asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:422-7.
131. Nicolau NC, Lowe LA, Murray CS, Woodcock A, Simpson A, Custovic A. Exhaled breath condensate pH and childhood asthma: unselected birth cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:254-9.
132. Borill Z, Starkey C, Vestbo J, Singh D. Reproducibility of exhaled breath condensate pH in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005;25:269-274.
133. Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:22-26.

134. Carpagnano GE, Spanvello A, Cruci C, et al. IL-2, TNF-alpha, and leptin: Local versus systemic concentration in NSCLC patients. *Oncol Res* 2007;16:375-381.
135. Montuschi P. New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate. Izd. P. Montuschi, CRC press, Boca Raton, Italija 2005.
136. Corhay JL, Weber G, Bury T, Mariz S, Roelandts I, Radermecker MF. Iron content in human alveolar macrophage. *Eur Respir J* 1992; 5:804-9.
137. Mateos F, Brock JH, Perez – Arellano JL. Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax* 1998;53:594-600.
138. Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 417-427.
139. Ghio AJ, Turi JL, Yang F, Garrick LM, Garrick MD. Iron homeostasis in the lung. *Biol Res* 2006;39:67-77.
140. Ciarallo, L, Sauer, A, Shannon, MW Intravenous magnesium therapy for moderate to severe pediatric asthma: results of a randomized, placebo-controlled trial. *J Pediatr* 1996;129,809-814.
141. Iseri, LT, French, JH Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 1984;108,188-193.
142. Cairns, CB, Kraft, M Magnesium attenuates the neutrophils respiratory burst in adult asthmatic patients. *Acad Emerg Med* 1996;3,1093-1097.
143. Evans DF, Robertson CS, Ledingham SJ, Kapila L.. Esophageal pH monitoring for gastroesophageal reflux: A United Kingdom study, *J Pediatr Surg* 1991;682-5.)
144. Montuschi P, Barnes PJ. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:232–7.
145. Petrovečki M, Bilić-Zulle L. Korelacija i regresija. u *Biostatistika u svakodnevnoj praksi*, ur. Šimundić A-M. Medicinska naklada 2008..
146. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1364-70.

147. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, i sur. Exhaled Breath Condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J* 2003;22: 889-94.
148. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002;57:926-9.
149. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Seyfarth HJ, Sack U, Engelmann L, Schauer J, and Wirtz H. Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir Med* 2003;97:1188–94.
150. Zhao JJ, Shimizu Y, Dobashi K, Kawata T, Ono A, Yanagitani N, Kaira K, Utsugi M, Hisada T, Ishizuka T, Mori M. The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18: 41-5.
151. Ojoo JC, Mulernnan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:22-6.
152. Effros RM, Casaburi R, Dunning M, Torday J, Biller J, Shaker R. The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:386-92.
153. Widdicombe J. “Acidopnea” and the dictionary. *Am J Respir Critl Care Med* 2003;167:800-1.
154. Ricciardolo FLM, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113: 610-9.
155. Holma B, Hegg PO. pH- and protein-dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus. Their interrelationships and influence on health. *Sci Total Environ.* 1989;84:71-82.
156. Luk CK, Dulfano MJ. Effect of pH, viscosity and ionic-strength changes on ciliary beating frequency of human bronchial explants. *Clin Sci (Lond).* 1983;64:449-51.
157. Hunt J, Yuanlin Y, Burns J, Gaston B, Ngamtrakulpanit L, Bunyan D, Walsh BK, Smith A, Hom S. Identification of acid reflux cough using serial

- assays of exhaled breath condensate pH. *Cough* 2006;2:3. doi:10.1186/1745-9974-2-3.
158. Shimizu Y, Dobashi K, Zhao JJ, Kawata T, Ono A, Yanagitani N, Kaira K, Utsugi M, Hisada T, Ishizuka T, Mori M. Proton pump inhibitor improves breath marker in moderate asthma with gastroesophageal reflux disease. *Respiration*. 2007;74:558–64.
 159. Shimizu Y, Dobashi K, Mori M. Exhaled breath marker in asthma patients with gastroesophageal reflux disease. *J Clin Biochem Nutr*. 2007 Nov;41(3):147-53.
 160. Carpagnano G.E., Resta O., Ventura M.T., Amoruso A.C., Di Gioia G., Giliberti T., Refolo L., Foschino-Barbaro M.P. Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma. *J Intern Med* 2006;259:323–331.
 161. ATS Workshop Proceedings: Exhaled breath condensate nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:131-45.
 162. Bloemen K, Lissens G, Desager K, Schoeters G. Determinants of variability of protein content, volume and pH of exhaled breath condensate *Respir Med* 2007;101:1331-7.
 163. Kullman T, Barta I, Lazar Z, Szili B, Barat E. Valyon M, Kollai M, Horvath I. Exhaled breath condensate pH standardised for CO₂ partial pressure. *Eur Respir J*. 2006;28:252–3.
 164. Borrill ZL, Smith JA, Naylor J, Woodcock AA, Singh D. The effect of gass standardisation on exhaled breath condensate pH. *Eur Respir J* 2006; 28:251-2.
 165. Koeslag J. The lungs: our defense against the ravages of fresh air. http://academic.sun.ac.za/med_physbio/med_physiology/dept/LUNGS.HTM, available January, 1st, 2007.
 166. Treacher DF, Leach RM. ABC of oxygen. Oxygen transport-1. Basic principles. *BMJ* 1998;317: 1302-6.

167. Rozycki HJ, Sysyn GD, Marshall MK, Malloy R, Wiswell TE. Mainstream end-tidal carbon dioxide monitoring in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 1998;101:648-53.
168. Reinhold P, Jaeger J, Schroeder C. Evaluation of methodological and biological influences on the collection and composition of exhaled breath condensate. *Biomarkers* 2006;11:118-42.
169. Heilig EA, Thompson KJ, Molina RM, Ivanov AR, Brain AR, Wessling-Resnik M. Manganese and Iron Transport Across Pulmonary Epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:1247-59.
170. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, et al. Differential regulation of antioxidants enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 1991;266:1301-1307.
171. Mutti A, Corradi M, Goldoni M, et al. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest* 2006; 129:1288-1297.
172. Griese M, Noss J, Schramel P. Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2003; 2:136-142.
173. Stites SW, Mark W. Plautz, et al. Increased concentrations of iron and iso-ferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:796-801.
174. Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A. Induction of Ferritin Synthesis by Oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 1995;270:700-703.
175. Miller CC, Miller SC, Torti SV, et al. Iron-independent induction of ferritin H-chain by tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4946-4950.
176. Danzeisen R, Achsel T, Bederke U, Cozzolino M, Crosio C, ferri A, Frenzel M, Butler Gralla E, Huber L, Ludolph A, Nencini M, Rotilio G, Valentine JS, Carri MT. Superoxide dismutase 1 modulates expression of transferrin receptor. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2006;11:489-98.

177. Britigan BE, Hayek MB, Doebebling BN, et al. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1993; 61:5049-5055.
178. Stites SW, Walters B, O'Brien-Ladner AR, et al. Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis. *Chest* 1998; 114:814-819.
179. Ghio AJ, Carter JD, Samet JM, Reed W, Quay J, Dailey LA, Richards JH, Devlin AR. Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells. *Lung Cell Mol Physiol* 1998;18:L728-L736..
180. Effros RM, Murphy C, Hacker A, Schapira RM, Bongard R. Reduction and uptake of methylene blue from rat air spaces. *J Appl Physiol*. 1994;77:1460-5.
181. de Valk HW, Kok PT, Struyvenberg A, van Rijn HJ, Haalboom JR, Kreukniet J, Lammers JW. Extracellular and intracellular magnesium concentrations in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1993;6:1122-1125.
182. Trian T, Benard G, Begueret H, Rossignol R, Girodet PO, Ghosh D et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma. *J Exp Med* 2007;204:3173-3181.
183. Kakish KS. Serum magnesium levels in asthmatic children during and between exacerbations. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:181-183.
184. Mirčetić RN, Dodig S, Raos M, Petres B, Čepelak I. Magnesium concentration in plasma, leukocytes and urine of children with intermittent asthma. *Clin Chim Acta* 2001;312:197-203.
185. Hashimoto Y, Nishimura Y, Maeda H, Yokoyama M. Assessment of magnesium status in patients with bronchial asthma. *J Asthma* 2000;37:489-496.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. 09. 1978. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala sam od 1985. -1993. godine. Od 5. razreda osnovne škole upisana sam u razred klasične naobrazbe, pa tako tijekom osnovnog i srednjeg školovanja učim klasične jezike: grčki i latinski s kojim sam sudjelovala na državnom natjecanju i osvojila 1. mjesto.

Nakon završene Klasične gimnazije u Zagrebu i upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu 1997. godine. Tijekom studija bila sam demonstrator iz patologije. Diplomirala sam 2004. godine (prosjek 4,06). Nakon pripravničkog staža u Klinici za dječje bolesti Zagreb položila sam stručni ispit 2005.

U akademskoj godini 2005./2006. upisala sam doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2005.g. zaposlena sam u Dječjoj bolnici Srebrnjak kao znanstveni novak na projektu „Biokemijski biljezi u izdahnutom kondenzatu djece s plućnim bolestima” (br. 0277001), a od 2006. na projektu „Kondenzat izdaha kao izvor biomarkera plućnih bolesti u djece” (br. 277-2770966-0965).

Od 1.ožujka 2007. godine započinjem sa specijalizacijom iz pedijatrije u Dječjoj bolnici Srebrnjak.

Objavila sam pet znanstvenih radova (četiri u CC-časopisima). Aktivno sam sudjelovala na europskim i domaćim kongresima.

Od 2004. članica sam Hrvatske liječničke komore, te od 2006. članica Europske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju.